



**UNIVERSITÉ EVRY VAL D'ESSONNE**

**Ecole Doctorale des Génomes Aux Organismes**

**Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement**

NNT : XXXXEVRYXXXX

## **THÈSE**

présentée et soutenue publiquement le 30 Septembre 2013

pour l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université d'Evry Val d'Essonne**

**Discipline ou Spécialité : Physico-Chimie Moléculaire**

par :

**Aziz FENNOURI**

# **Analyse de molécules individuelles de glucides bioactifs confinées dans des nanopores**

## **COMPOSITION DU JURY**

<b>Présidente du jury :</b>	<b>Mme Jeanine TORTAJADA</b>	Professeur, Université Evry Val d'Essonne
<b>Rapporteur :</b>	<b>M. Jan C. BEHREND</b>	Professeur, Université de Freiburg
<b>Rapporteur :</b>	<b>M. David BONNAFFE</b>	Professeur, Université Paris Sud
<b>Directeur de thèse :</b>	<b>M. Loïc AUVRAY</b>	Professeur, Université Paris 7 Diderot
<b>Encadrant de thèse :</b>	<b>M. Laurent BACRI</b>	Maître de Conférences, Université Evry
<b>Encadrant de thèse :</b>	<b>M. Régis DANIEL</b>	Directeur de recherche, Université Evry

A ma femme, mes parents, ma sœur, toute ma famille ainsi que mes amis.

---

# Remerciements

---

Je souhaite tout d'abord remercier mon directeur de thèse, Loïc Auvray, ainsi que mes encadrants, Laurent Bacri et Régis Daniel, sans qui je n'aurais pas pu réaliser cette thèse. Je vous remercie pour la formation que vous m'avez prodiguée tout au long de ces années. Merci également à Jeanine Tortajada, directrice du Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement (LAMBE), pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Un grand merci à Cécile Huin et Jérôme Mathé, pour tout le temps que vous m'avez consacré. Votre aide et vos conseils m'ont été précieux et ma thèse ne se serait pas déroulée aussi bien sans vous. Merci à Ghani Oukhaled et Cédric Przybylski. Toutes les discussions scientifiques que j'ai pu avoir avec vous ont été très bénéfiques pour l'avancée de mes travaux ainsi que pour ma culture scientifique.

Je tiens à remercier tous les membres permanents du laboratoire avec qui j'ai pu être en contact, comme Olek Maciejak, Nathalie Jarroux, Véronique Celton, Christine Guis, Hervé Cheradame, Florence Gonnet, Emmanuelle Leon, Isabelle Salard, Véronique Legros, Delphine Pflieger, Violette Haldys, ainsi que les autres qui ne sont pas cités et également Frédérique Augougnon et Ketty Fixot.

Je remercie tout particulièrement ma femme Laila, qui a commencé sa thèse en même temps que moi, et qui a terminé un tout petit peu avant moi. Nous avons effectué le même parcours tout au long de cette thèse, nous permettant de nous entraider l'un l'autre. Je te remercie entre autres pour ton soutien tout au long de la thèse.

Merci à Elodie pour tous les moments qu'on a passé à rigoler mais également à travailler. Je te remercie pour l'aide que tu m'offrais chaque fois que j'en avais besoin et pour avoir rendu certains jours, semaines voire même mois sans aucun pore, moins déprimants. Merci également à Céline pour ton aide durant la 1ère moitié de ma thèse (et après également), que l'on a passée ensemble jour après jour dans le laboratoire, à chercher à améliorer l'insertion d'un unique nanopore dans nos membranes, jusqu'à ta soutenance.

Mes remerciements vont ensuite à tous les doctorants qui ont préparé leur thèse en même temps que moi. Certains ont soutenu avant moi, parmi lesquels Laila, Céline, Emilie, Bazoly, Daniel et bien d'autres. Je vous souhaite une très bonne continuation pour votre vie professionnelle. Les autres, Elodie, Ibrahima, Ruddy, Guillaume, Lisday, Kahina, Johana, Ania, Pierre, Julien, Sondra et Afef, je vous souhaite bon courage pour la fin de vos thèses, en espérant qu'elle se passe au mieux pour chacun d'entre vous.

Je souhaite également remercier Pascal Martin, avec qui je travaille actuellement en tant qu'ATER à l'université Paris VII Diderot, pour m'avoir permis de me libérer plusieurs journées pour préparer au mieux ma soutenance de thèse.

Enfin, je remercie tous ceux qui m'ont aidé pour la préparation de ma soutenance : Laila, Elodie, Cécile, Jérôme, Olek, Pierre, Julien, Ania, Johana et Kahina. Sans vous, ma présentation n'aurait pas été aussi bien ni aussi claire.

---

# Résumé

---

Les glycosaminoglycanes (GAGs) sont des polysaccharides bio-actifs exprimés à la surface des cellules et dans la matrice extracellulaire. Ils sont à l'origine d'un grand nombre de processus physiologiques et pathologiques tels que le développement embryonnaire, la croissance cellulaire et la différenciation, l'homéostasie, la réponse inflammatoire, la croissance tumorale et les infections microbiennes. Parmi tous les biopolymères, ils sont ceux qui offrent le plus grand potentiel d'information grâce à la grande variété de combinaisons et de modifications régio-sélectives des monosaccharides les constituant. En conséquence, l'analyse structurale des polysaccharides représente un des défis des glycosciences les plus difficiles à relever.

De nouvelles approches basées sur la détection à l'échelle de la molécule unique présentent un grand intérêt en biologie, permettant l'observation directe et la nano-manipulation de biomolécules. Principalement utilisées pour l'étude des acides nucléiques ou des protéines, ces approches n'ont que rarement été appliquées à l'étude des polysaccharides. Basé sur l'utilisation de canaux protéiques nanométriques pour la détection et la caractérisation de différents analytes à l'échelle de la molécule unique, nous présentons ici la détection d'oligo-glycosaminoglycanes individuels confinés dans un nanopore protéique d'aérolysine et d' $\alpha$ -hémolysine.

L'héparine, l'emblématique représentant des GAGs, est un polysaccharide linéaire, hautement anionique, composé de la répétition d'unités disaccharidiques composées d'un acide uronique et d'une glucosamine substituée par des groupements sulfate à différentes positions. Ces chaînes moléculaires sont hautement hétérogènes, de différentes longueurs et présentent différents profils de sulfatation. Dans cette étude, nous avons d'abord étudié un GAG plus simple, l'acide hyaluronique (HA), par translocation à travers un nanopore. Le disaccharide constitutif de l'acide hyaluronique est composé d'un acide glucuronique lié par une liaison  $\beta(1,3)$  à une glucosamine N-acétylée. Ces disaccharides sont reliés entre eux par des liaisons  $\beta(1,4)$  ([4]-D- $\beta$ -GlcA-(1 $\rightarrow$ 3)-D- $\beta$ -GlcNAc-(1 $\rightarrow$ )] mais ne contiennent pas de groupement sulfate. Nos résultats montrent la capacité de cette nouvelle technique analytique à discriminer les oligosaccharides d'HA selon leur degré de polymérisation, d'après la durée, la fréquence et l'amplitude des blocages de courants. La preuve de la translocation de ces oligosaccharides à travers le nanopore a été montrée par spectrométrie de masse. Cette approche nous a permis de suivre la dépolymérisation enzymatique de l'acide hyaluronique par la hyaluronidase ainsi que de déterminer les paramètres cinétiques de cette réaction. D'autres oligosaccharides tels que l'héparine, le dermatane sulfate et le dextrane sulfate ont également été étudiés, présentant des signatures caractéristiques différentes, mettant en évidence des différences de structures et/ou de conformations entre ces oligosaccharides.

**Mots-clés :** polysaccharides, glycosaminoglycanes, acide hyaluronique, héparine, dermatane sulfate, dextrane sulfate, nanopore, aérolysine,  $\alpha$ -hémolysine, spectrométrie de masse, réaction enzymatique, enzyme, hyaluronidase.



---

# Abstract

---

Glycosaminoglycans (GAGs) are bio-active polysaccharide expressed at the cell surface and in the extra-cellular matrix, which mediate cell-cell and cell-matrix interactions at the origin of a variety of physiological and pathological activities such as in embryonic development, cell growth and differentiation, homeostasis, inflammatory response, tumor growth and microbial infection. Among all biopolymers, they offer the largest potential of information owing their incomparable variety of combinations and region-selective modifications of their building monosaccharides. As a consequence, the structural analysis of such complex carbohydrates is recognized as one of the most challenging task of glycosciences, and represents a major hindrance in the structure-activity relationship establishment.

New approaches based on single-molecule detection are currently arousing great interest in biology as it allows the direct observation and nano-manipulation of bio-molecules. Mainly applied to the study of nucleic acid and proteins, these approaches have been not often used for the study of complex carbohydrates. Based on the promising use of nanometer-scale protein channels as ultrasensitive biosensors for the detection and characterization of various analytes at the single molecule level, we report here on the detection of individual glycosaminoglycan oligosaccharides confined in aerolysin and  $\alpha$ -hemolysin proteic nanopores.

The emblematic GAGs representative heparin is a highly anionic, linear polysaccharide made of disaccharides repeating units composed of an uronic acid and a glucosamine substituted with sulfate groups in various positions. It results in a highly heterogeneous molecular chain exhibiting variable length, sulfation pattern and domain organization. In this study, we have studied a simpler model of this GAGs organization by investigating the nanopore translocation of hyaluronic acid (HA) oligosaccharides. HA is composed of D-glucuronic acid- $\beta(1,3)$ -N-acetyl-D-glucosamine disaccharide units linked together through  $\beta(1,4)$  glycosidic bonds ([4)-D- $\beta$ -GlcA-(1 $\rightarrow$ 3)-D- $\beta$ -GlcNAc-(1 $\rightarrow$ )]), but is devoid of sulfate groups. Our results show the capability of this new approach to discriminate HA oligosaccharides according to their polymerization degree based on the analysis of duration, frequency and amplitude of the current blockades. This feature prompted us to apply this approach to the enzyme monitoring of the hyaluronidase-catalyzed depolymerization of HA and the determination of the kinetic parameters of this reaction. Translocation of those oligosaccharides has also been proved by mass spectrometry. Other oligosaccharides like heparin, dermatan sulfate and dextran sulfate, have also been studied, showing different characteristic “fingerprints”. This is due to structure and/or conformation differences between these oligosaccharides.

**Keywords:** polysaccharides, glycosaminoglycans, hyaluronic acid, heparin, dermatan sulfate, dextran sulfate, nanopore, aerolysin,  $\alpha$ -hemolysin, mass spectrometry, enzyme reaction, enzyme, hyaluronidase.

---

# Table des matières

---

<b>Remerciements .....</b>	<b>3</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>4</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>5</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>6</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>10</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>11</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>17</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>19</b>
<b>I. Chapitre 1 : Analyse à l'échelle de la molécule unique : Polysaccharides et Nanopores .....</b>	<b>23</b>
<b>I.1. Les glycosaminoglycanes, une classe spéciale de polysaccharides. Enjeux .....</b>	<b>25</b>
I.1.1. Les glycosaminoglycanes : rôle et structure .....	26
I.1.2. Techniques d'analyse des polysaccharides .....	28
<b>I.2. Les principales méthodes d'analyse de biomolécules à l'échelle de la molécule unique .....</b>	<b>30</b>
I.2.1. Microscopie de fluorescence .....	31
I.2.2. Pinces optiques et magnétiques .....	32
I.2.3. AFM.....	34
I.2.4. Les nanopores.....	35
<b>I.3. Applications des techniques d'analyse à l'échelle de la molécule unique à l'étude des biomolécules.....</b>	<b>36</b>
I.3.1. Imagerie de polysaccharides à l'échelle de la molécule unique .....	37
I.3.2. L'AFM, un senseur de conformation des polysaccharides .....	39
I.3.2.a. Dénaturation mécanique des protéines .....	40
I.3.2.b. Spectroscopie de force de polysaccharides en molécule unique .....	41
I.3.2.c. Etude et discrimination d'isomères par AFM .....	48
<b>I.4. Les nanopores .....</b>	<b>52</b>
I.4.1. Historique .....	52
I.4.2. Différents types de nanopores utilisés pour des expériences de molécules uniques .....	53
I.4.2.a. Nanopores protéiques .....	53
Les $\alpha$ -PFT .....	53
Les $\beta$ -PFT .....	54
L' $\alpha$ -hémolysine.....	55
L'aérolysine .....	56
I.4.2.b. Ingénierie des nanopores biologiques .....	58
Modification de certains acides aminés par mutagénèse .....	59
Greffage dans le pore.....	61
Ajout d'adaptateur dans le pore .....	62
I.4.2.c. Les nanopores artificiels.....	64
Fabrication .....	64
Modifications chimiques .....	66
I.4.3. Applications .....	67

I.4.3.a.	Translocation de polymères : analyse des polymères ou du nanopore ? .....	67
I.4.3.b.	Séquençage d'acides nucléiques .....	70
L'expérience pionnière de Kasianowicz .....	70	
Contrôle du transport par modification biochimique .....	71	
Contrôle du transport par des paramètres physiques .....	71	
Utilisation d'un adaptateur dans le pore d' $\alpha$ -hémolysine .....	73	
Méthodes pour ralentir la translocation des acides nucléiques .....	75	
Analyse de doubles brins d'ADN et d'ARN à l'aide de nanopores synthétiques .....	78	
I.4.3.c.	Séquençage de peptides et protéines .....	80
Séquençage de peptides .....	80	
Analyse des protéines entières .....	82	
Analyse du dépliement de protéines .....	83	
I.4.3.d.	Interactions biomoléculaires .....	85
I.4.3.e.	Spectrométrie de masse par nanopore .....	87
<b>I.5.</b>	<b>Nanopores et polysaccharides .....</b>	<b>90</b>
I.5.1.	Etat de l'art .....	90
<b>I.6.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>91</b>
<b>I.7.</b>	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>92</b>
<b>II.</b>	<b>Chapitre 2 : Confinement et translocation d'oligo-glycosaminoglycanes à travers un nanopore protéique .....</b>	<b>103</b>
<b>II.1.</b>	<b>Les différents polysaccharides analysés .....</b>	<b>105</b>
<b>II.2.</b>	<b>Principe des expériences de nanopore .....</b>	<b>106</b>
<b>II.3.</b>	<b>Influence de différents paramètres sur la translocation .....</b>	<b>107</b>
II.3.1.	Nature du pore utilisé .....	107
II.3.2.	Variations du courant de pore ouvert .....	108
II.3.2.a.	Tension appliquée .....	108
II.3.2.b.	Effet de la force ionique .....	109
II.3.2.c.	Effet de la température .....	111
II.3.3.	Limite de détection en concentration de polysaccharides .....	113
II.3.4.	Influence de la force ionique sur le confinement et le transport .....	114
II.3.5.	Asymétrie d'entrée et de passage de l'acide hyaluronique à travers l'aérolysine .....	115
<b>II.4.</b>	<b>Translocation de glycosaminoglycanes à travers le pore d'aérolysine .....</b>	<b>117</b>
II.4.1.	Caractérisation et analyse des oligosaccharides d'acide hyaluronique monodisperses .....	117
Fréquences de translocation .....	120	
Durées de translocation .....	121	
II.4.2.	Caractérisation et analyse de mélanges d'oligosaccharides .....	122
<b>II.5.</b>	<b>Détection MS de la translocation .....</b>	<b>124</b>
<b>II.6.</b>	<b>Translocation d'oligosaccharides d'héparine à travers l'aérolysine .....</b>	<b>127</b>
<b>II.7.</b>	<b>Translocation de différents polysaccharides à travers l'<math>\alpha</math>-hémolysine .....</b>	<b>130</b>
II.7.1.	Caractérisation et analyse d'oligosaccharides d'acide hyaluronique monodisperses .....	131
II.7.2.	Mélanges d'oligosaccharides de différentes tailles .....	132
II.7.3.	Translocation d'oligosaccharides d'héparine .....	132
II.7.4.	Caractérisation et vérification de la translocation d'oligosaccharides de dermatane sulfate .....	133
II.7.5.	Dextrane sulfate .....	135
<b>II.8.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>140</b>

II.9.	Références bibliographiques.....	141
III.	<b>Chapitre 3 : Détection par nanopore d'une réaction enzymatique : dépolymérisation de l'acide hyaluronique catalysée par l'hydrolase hyaluronidase .....</b>	<b>143</b>
III.1.	Dégradation enzymatique des glycosaminoglycanes.....	146
III.2.	Etude de la réaction enzymatique de l'acide hyaluronique par spectroscopie UV .....	148
III.2.1.	Etude à une concentration de substrat fixée .....	148
III.2.1.a.	Spectroscopie UV-Visible .....	148
III.2.1.b.	Etalonnage .....	148
III.2.1.c.	Réaction enzymatique.....	149
III.2.2.	Etude à différentes concentrations de substrat .....	151
III.3.	Etude de la dépolymérisation enzymatique de l'acide hyaluronique par translocation à travers un nanopore .....	152
III.3.1.	Réaction enzymatique analysée à travers un pore d'aérolysine .....	152
III.3.1.a.	Suivi indirect de la réaction enzymatique par nanopore .....	153
	Conditions de la réaction de dépolymérisation .....	153
	Choix de la solution tampon utilisée pour la détection nanopore.....	153
	Caractérisation par spectrométrie de masse .....	154
	Caractérisation par translocation à travers un nanopore .....	157
III.3.1.b.	Suivi de la réaction en temps réel.....	159
III.3.2.	Calcul des concentrations en oligosaccharides d'acide hyaluronique présents en solution, à différents instants de la réaction enzymatique.....	162
III.3.3.	Etude de la cinétique de la réaction enzymatique .....	163
III.3.4.	Réaction enzymatique analysée à travers un pore d'α-hémolysine .....	166
III.4.	Comparaison des données obtenues par nanopore et par spectroscopie UV .....	169
III.5.	Conclusion .....	170
III.6.	Références bibliographiques.....	171
IV.	<b>Chapitre 4 : Matériels et méthodes.....</b>	<b>173</b>
IV.1.	Matériels et réactifs .....	175
IV.1.1.	Oligosaccharides d'acide hyaluronique et d'héparine .....	175
IV.1.2.	Canaux protéiques.....	175
	Vérification de la pureté de la préparation de l'aérolysine .....	175
IV.1.3.	Lipides.....	178
IV.2.	Montage expérimental pour les expériences nanopores.....	178
IV.2.1.	Equipement .....	178
IV.2.2.	Formation de la membrane lipidique.....	179
IV.2.3.	Insertion du pore dans la membrane .....	180
IV.3.	Conditions expérimentales pour la mesure du transport à travers un nanopore .....	181
IV.3.1.	Transport d'oligosaccharides individuels .....	181
IV.3.2.	Réaction enzymatique réalisée hors du compartiment nanopore.....	181
IV.3.3.	Réaction enzymatique réalisée directement dans le compartiment nanopore.....	181
IV.4.	Traitement du signal obtenu lors des expériences nanopore.....	182
IV.5.	Analyse MS des oligosaccharides ayant traversé le nanopore .....	184
IV.5.1.	Dessalage des échantillons.....	184
IV.5.2.	Analyse ESI-MS des compartiments <i>trans</i> , après translocation des molécules .....	186

IV.5.3. Analyse MALDI-TOF des échantillons récupérés après analyse .....	186
<b>IV.6. Réaction enzymatique suivie par spectroscopie UV-Visible .....</b>	<b>189</b>
<b>IV.7. Références bibliographiques .....</b>	<b>190</b>
<b><i>Conclusions et Perspectives .....</i></b>	<b><i>191</i></b>
<b><i>Annexes .....</i></b>	<b><i>197</i></b>
<b><i>Publications .....</i></b>	<b><i>201</i></b>

---

# Liste des tableaux

---

<i>Tableau 1 : Date de découverte de différentes techniques utilisées pour les analyses en molécule unique. ....</i>	<i>31</i>
<i>Tableau 2: Les différentes conformations d'un cycle uronique. [70] .....</i>	<i>41</i>
<i>Tableau 3 : Récapitulatif des différences entre l'aérolysine et l'<math>\alpha</math>-hémolysine. ....</i>	<i>108</i>
<i>Tableau 4 : Différences entre le tampon de digestion et le tampon nanopore pour la détection nanopore. ....</i>	<i>153</i>
<i>Tableau 5 : Comparaison des concentrations en chaînes d'acide hyaluronique en solution à différents temps de réaction (30 minutes et 10 heures), à 21 et à 37 °C, analysé par nanopore ou par spectroscopie UV-Visible.....</i>	<i>169</i>

---

# Liste des figures

---

Figure 1 : Structure de quelques polysaccharides, l'amidon, composé d'amylose et d'amylopectine, et la cellulose. [1]	25
Figure 2 : Structure du pentasaccharide d'héparine permettant la formation du complexe Antithrombine III - Héparine. Les groupements encadrés d'un trait continu sont ceux nécessaires à la formation de ce complexe, tandis que ceux encadrés en pointillés augmentent l'affinité de liaison sans toutefois être indispensables. [9]	27
Figure 3 : Structures chimiques des différents glycosaminoglycanes. [5]	27
Figure 4 : Analyses RMN 2D $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ de trois GAGs, la chondroïtine sulfate A, le dermatane sulfate et l'héparane sulfate. ....	28
Figure 5 : Spectre de masse $\text{MS}^2$ d'un disaccharide monosulfaté du dermatane sulfate obtenu par ESI-MS. Dans l'insert en haut à gauche se trouve la structure chimique de ce disaccharide monosulfaté. [12]	30
Figure 6 : Représentation des expériences de pinces optiques. La bille diélectrique est représentée en bleu. La distance X correspond à l'écartement de la bille diélectrique du centre du faisceau de lumière. [26]	32
Figure 7 : (A) Schéma représentatif d'une expérience avec des pinces magnétiques. L'aimant se déplace sur l'axe vertical ou opère une rotation sur lui-même pour entraîner un déplacement de la molécule. (B) Extension en $\mu\text{m}$ de la molécule en fonction du nombre de rotations de la bille aimantée. [27]	33
Figure 8 : Schéma représentant le fonctionnement de l'AFM. On voit ici le microlevier avec sa pointe, la surface à analyser et le rayon laser. ....	34
Figure 9 : Exemples d'expériences mettant en œuvre un polymère traversant un nanopore (A) artificiel [45] ou (B) protéique [46]. ....	35
Figure 10 : Structure chimique (A) d'une pectine et (B) de l'acétane.....	37
Figure 11 : Images d'un phage $\lambda$ d'ADN (A) incurvé ou (B) rectiligne [51]. ....	38
Figure 12 : (a à d) Images de molécules de pectine (a) linéaire, non branchée, (b) avec une ramification, (c) complexe de polymères branché et non branché et (d) possédant plusieurs ramifications[60]. (e) Image d'une chaîne d'acide hyaluronique. [56].....	39
Figure 13 : (A) Courbes d'extension de la titine, constituée de 8 domaines d'Ig. (B) Superposition de ces courbes d'extension de la titine. On observe un motif en dents de scie correspondant à la dénaturation de chacun des domaines Ig l'un après l'autre. La distance entre chaque dent de scie est exactement de 25 nm. [65]	40
Figure 14 : Modèle mécanique simplifié du cycle pyranose montrant les points d'application des forces ainsi que les points de pivot imaginaires [69]. ....	42
Figure 15 : « Empreintes digitales » de différents polysaccharides possédant 0, 1 ou 2 liaison(s) glycosidique(s) axiale(s), accompagnés de leur structure. [69] .....	42
Figure 16 : (A) Déformation du cycle pyranose du dextrane à différentes forces d'extension. (B) En noir, courbe force-extension de 5 unités glucose du dextrane, obtenues par simulations moléculaires et en gris, superposition de 10 courbes force-extension normalisées, mesurées sur le dextrane natif. [39]	43
Figure 17 : (A) Superposition de plusieurs courbes force/extension de dextrane carboxyméthylé. Les courbes sont normalisées d'après la longueur du polymère. (B) Courbes d'extension successives de la même molécule de dextrane, ne montrant aucune hystérésis. [39]	44
Figure 18 : (A) Superposition de différentes courbes d'extension normalisées d'amylose carboxyméthylée. (B et C) Courbes d'extension normalisées de (B) la cellulose carboxyméthylée et (C) de l'héparine. [72].....	45
Figure 19 : (A) Superposition de différentes courbes d'extension normalisées du xanthane dénaturé. (B) Courbe d'extension du xanthane natif montrant un plateau lorsque la force appliquée devient supérieure à 400 pN. (C) Courbes d'extension successives d'une même molécule de xanthane natif. La déformation des courbes montre la destruction de l'hélice du xanthane. (D) Structure chimique du xanthane. [73]	46
Figure 20 : Courbes d'extension de (A) l'acide hyaluronique, (B) la chondroïtine sulfate et (C) le dermatane sulfate. En insert sont représentées les structures chimiques de ces trois polysaccharides. [77].....	47
Figure 21 : Courbes force-extension (A) d'un polysaccharide possédant zéro, un ou deux clics, obtenues par simulation, (B) du dextrane dans l'eau et (C, D et E) de la pectine approximée par les trois différents modèles (zéro, un ou deux	

clics). Les cercles sont les points expérimentaux et le trait plein correspond à l'approximation obtenue par simulation. [71].....	48
Figure 22 : (A) Structures fines des acides mannuronique et glucuronique. (B) et (C) Possibles séquences moléculaires reliant plusieurs molécules d'acides mannuronique et glucuronique. [8].....	49
Figure 23 : Courbes force-extension de différents alginates, possédant différents ratios en acide glucuronique obtenues par (A) simulation ou par (B) expérience. [8].....	49
Figure 24 : (A) Comparaison entre les courbes d'extension du $\beta$ -galactane (en noir) et de l'amylose (en gris). (B) Structures chimiques de l'amylose et du galactane. [78] .....	50
Figure 25 : Courbes de force obtenues pour (A) l'agarose et (B) le carraghénane. Chacune de ces molécules montre plusieurs courbes, correspondant à plusieurs fractions différentes. (C) Superposition des courbes bleue de (A) et rouge de (B) avec celle de l'amylose. [58].....	51
Figure 26 : Structure de 2 $\alpha$ -PFT, (a) la colicine et (b) la toxine diphtérique. [89] .....	54
Figure 27 : Structure de 3 monomères de $\beta$ -PFT, (a) l' $\alpha$ -hémolysine, (b) l'aérollysine et (c) l'antigène protecteur de l'anthrax. [89] .....	54
Figure 28 : Du monomère d' $\alpha$ -hémolysine au canal ionique transmembranaire. [90] .....	55
Figure 29 : Vue (A) de face et (B) de dessus du pore d' $\alpha$ -hémolysine. (C) Un monomère d' $\alpha$ -hémolysine. [91] .....	56
Figure 30 : Vue (A) de dessus et (B) de face du canal ionique d'aérollysine. [87] .....	57
Figure 31 : (A) Monomère de proaérollysine avec les 4 différents domaines : D I, D II, D III et D IV et (B) Proaérollysine organisée en dimère en solution. [100] .....	58
Figure 32 : (A) Schéma en coupe de l' $\alpha$ -hémolysine sur lequel les résidus remplacés par mutagenèse sont représentés par différentes couleurs. (B) Vue de dessus et de face du canal transmembranaire contenant un anneau d'arginine à la place des méthionines 113. [107] .....	60
Figure 33 : Deux autres exemples de pores d' $\alpha$ -hémolysine modifiés par mutagenèse, sur différents résidus. [102, 103] .....	60
Figure 34 : (A) Vue de face du pore d' $\alpha$ -hémolysine montrant un site de liaison pour les métaux divalents, formés par quatre histidines. (B) Zoom effectué sur le site de liaison. [105] .....	61
Figure 35 : Représentation de pores d' $\alpha$ -hémolysine (A) Wild Type [114] et (B) mutant [116] contenant une $\beta$ -cyclodextrine proche de la constriction du pore. Sur la figure (B), la $\beta$ -cyclodextrine est aminée. ....	62
Figure 36 : Différentes traces montrant, à + et - 40 mV, l'évolution des durées de liaison de la $\beta$ -cyclodextrine à l'intérieur du pore, en fonction de la modification par mutagenèse effectuée. [114].....	63
Figure 37 : Exemples de peptides cycliques utilisés comme adaptateurs dans le nanopore. [117] .....	64
Figure 38 : Différentes techniques de formation de nanopores solides, avec de multiples canaux dans des membranes de type track-etch (A) ou un unique canal conique formé par gravure d'une membrane en verre ou de polymère. [120] .....	65
Figure 39 : Nanopores artificiels formés par (A) faisceau ionique FIB [120] et (B) par faisceau d'électrons [122]. ....	66
Figure 40 : Modification chimique des surfaces internes et externes d'un nanopore formé dans une membrane d'or. [120].....	66
Figure 41 : (A) Analyse de la densité spectrale en présence (en haut) et en l'absence (en bas) de PEG 1000 en solution [130]. (B) Evolution de la fréquence des événements en fonction de la concentration en polymères pour un PEG 35kDa [140].....	69
Figure 42 : Pores d' $\alpha$ -hémolysine modifiés par une cystéine en position 17 (A) permettant de lier un oligonucléotide au pore [112], en position 106 (B) ou en position 8 (C) pour y lier une molécule de PEG [109]. ....	69
Figure 43 : Evolution de différents paramètres : le courant de pore ouvert en fonction de (A) la tension et de (B) la température, la vitesse des molécules en fonction de la tension (C) et le temps de translocation de différents polynucléotides en fonction de la température (D). [171].....	71
Figure 44 : (A) Nuage de points représentant le temps de translocation de deux différents polynucléotides (Poly(dA) <sub>100</sub> en bleu et Poly(dC) <sub>100</sub> en rouge) en fonction de l'intensité de blocage résultante. (B) Histogramme des durées d'événements pour les deux mêmes polynucléotides. (C) Trace de courant montrant la possibilité de discriminer les molécules de poly(dA) <sub>100</sub> des poly(dC) <sub>100</sub> d'après leur temps de translocation. [142] .....	72



Figure 45 : (A) Trace de courant correspondant à un mélange des quatre dNMPs passant à travers un pore d' $\alpha$ -hémolysine modifié (M113R) dans lequel se trouve une amino-cyclodextrine. (B) Histogramme des intensités de blocage montrant la possibilité de discriminer les quatre dNMPs d'après leur intensité de blocage. [116] .....	73
Figure 46 : (A) Trace de courant plus précise, montrant la discrimination entre les quatre dNMPs traversant un pore d' $\alpha$ -hémolysine modifié et contenant une amino-cyclodextrine modifiée également. (B) Histogramme des intensités de blocage des différents dNMPs. [84] .....	74
Figure 47 : (A) Schéma montrant le pore d' $\alpha$ -hémolysine, les brins d'ADN et l'exonucléase ExoI en solution. (B) et (C) Histogrammes des intensités de blocage de chacun des différents nucléotides provenant de simples brins d'ADN. [84]	75
Figure 48 : (A) Codage de la molécule source d'ADN en un simple brin d'ADN plus long. (B) Préparation de la molécule à analyser avec les balises présentes à différents endroits pour pouvoir être vues lorsqu'elles fluorescent (C) . La séquence initiale peut ensuite être retrouvée. [174] .....	76
Figure 49 : (A) Schéma représentant un nanopore d' $\alpha$ -hémolysine avec un simple brin bloqué en son intérieur par un complexe biotine/streptavidine. (B), (C) et (D) Histogrammes des intensités de blocage de chaque nucléotide discriminé à l'intérieur du pore. [153] .....	77
Figure 50 : (A) Schéma représentant un simple brin d'ADN dans un pore d' $\alpha$ -hémolysine sur lequel vient se placer une polymérase. L'histogramme en (B) correspond à l'intensité de blocage de la molécule bloquée dans le pore en fonction du temps, sur laquelle la polymérase opère la réplication[159]. (C) Exemple de séquence d'ADN utilisée. (D) Trace de courant caractéristique de ce type d'analyse utilisant une polymérase. (E) Représentation du déplacement des molécules en solution. [160] .....	78
Figure 51 : (A) Schéma représentant la molécule hybride ADN double brin – ADN simple brin traversant un nanopore artificiel par son extrémité double brin. (B) Traces représentant la translocation de ces molécules hybrides. [149] .....	79
Figure 52 : (A) 3 peptides analysés ainsi que la trace de courant en résultant. (B) Nuage de points représentant le temps de blocage en fonction de l'intensité de blocage. [181] .....	80
Figure 53 : (A) Représentation du pore d' $\alpha$ -hémolysine modifié en positions 113, 145 et 147. (B) Histogramme de courant discriminant les différents peptides en fonction de leur taux de blocage. (C) Trace du mélange de peptides. [187] .....	81
Figure 54 : (A) Exemple de nanotube conique dont les parois internes ont été fonctionnalisées par des molécules de PEG [193]. (B) Nanopore solide au travers duquel traversent des molécules de BSA [191]. .....	82
Figure 55 : Evolution de la fréquence de blocage en fonction de la concentration en chlorure de guanidium. [200] .....	84
Figure 56 : (A) Exemple d'un événement causé par une protéine partiellement (à gauche) ou totalement (à droite) dépliée [167]. (B) Histogramme des intensités de blocage montrant la nette séparation entre les protéines dépliées (en bleu) et les protéines natives (en rouge), nuage de points et histogramme des durées de passage [201]. .....	84
Figure 57 : Application des nanopores à la spectroscopie de force à l'échelle de la molécule unique. [207] .....	86
Figure 58 : Trace de courant montrant les différences de taux de blocage pour un mélange de PEG 1500 polydisperse. [218] .....	87
Figure 59 : Application de la technique des nanopores à la spectrométrie de masse. (A) Spectre de masse obtenu par nanopore avec en rouge la distribution d'une solution de PEG polydisperse et en bleu une solution de PEG monodisperse. (B) Spectre de masse classique obtenu par MALDI-TOF. [218] .....	88
Figure 60 : (A à G) Histogrammes des intensités normalisées de blocage obtenus pour des molécules de PEG polydisperse, pour plusieurs pores individuels d' $\alpha$ -HL, en parallèle. (H) Histogramme combiné des sept expériences individuelles A à H, auquel est superposé l'histogramme des intensités normalisées de blocage pour des molécules de PEG 28 monodisperse, en rouge. [220] .....	89
Figure 61 : Structure de l'acide hyaluronique. Les unités disaccharidiques sont toutes les mêmes et ne se différencient pas les unes des autres. ....	105
Figure 62 : Structure de l'héparine avec les différentes possibilités pour les isomères (épimérisation en vert et/ou les différentes sulfatations possibles en rouge). ....	106
Figure 63 : Schéma représentant le principe de fonctionnement des expériences nanopore. ....	107
Figure 64 : Courbe Intensité/Potentiel des pores (A) d' $\alpha$ -hémolysine et (B) d'aérolysine à 1M KCl. ....	109
Figure 65 : Evolution de l'intensité à différentes forces ioniques, en fonction de la tension appliquée pour un pore (A) d' $\alpha$ -hémolysine ou (B) d'aérolysine. ....	110

Figure 66 : Evolution de l'intensité à $\Delta V = 70$ mV pour les pores d'aérolysine (les points verts) et d' $\alpha$ -hémolysine (les points rouges) en fonction de la concentration en KCl. ....	110
Figure 67 : Superposition de courbes Intensité/Potentiel d'un pore d' $\alpha$ -hémolysine faites à différentes températures. ....	111
Figure 68 : Evolution de l'intensité d'un pore d' $\alpha$ -hémolysine en fonction de la température aux tensions de +120 mV (en rouge) et -120 mV (en bleu). ....	112
Figure 69 : Différentes traces enregistrées à différentes températures dans la gamme 2°C – 25 °C à 120 mV, dans une solution tampon HEPES 5 mM, KCl 1 M, pH 7,5. ....	112
Figure 70 : Relation linéaire entre la fréquence de blocage et la concentration en molécules de décasaccharides en solution dans KCl 1 M, 5 mM HEPES, pH 7,5. $\Delta V = 70$ mV. ....	114
Figure 71 : Evolution du temps de translocation avec l'augmentation de la concentration en KCl, dans KCl 1 M (en rouge), 2 M (en bleu) ou 3 M (en vert), 5 mM HEPES, pH 7,5. $\Delta V = 70$ mV. Les distributions sont normalisées pour une durée d'expérience de 1 seconde. ....	115
Figure 72 : Différences de fréquences d'événements en fonction du côté par où rentrent les molécules dans le pore. Les molécules, un mélange d'oligosaccharides de l'acide hyaluronique, traversent le pore (A) du compartiment cis vers le compartiment trans ou (B) du compartiment trans vers le compartiment cis. (C) et (D) Histogramme des durées d'événements correspondants au passage (C) du compartiment cis vers le trans et (D) du trans vers le cis. ....	116
Figure 73 : Spectres de masse MALDI-TOF des (A) hexa-, (B) octa- et (C) décasaccharides de l'acide hyaluronique, avec en dessous un zoom autour de la masse molaire de l'oligosaccharide. Les spectres ont été obtenus en mode réflectron, en polarité négative. La matrice utilisée est HABA/TMG <sub>2</sub> ajoutée au ratio 1/1 avec l'analyte. La tension d'accélération est de 20 kV et le pourcentage de grille est de 70%. Le délai d'extraction est de 300 nsec. ....	119
Figure 74 : Exemples de traces électriques des (A et D) déca-, (B et E) octa- et (C et F) hexasaccharide de l'acide hyaluronique dans une solution tampon KCl 1 M, 5 mM HEPES, pH 7,5 à travers un nanopore d'aérolysine, à une tension de 70 mV. ....	120
Figure 75 : Fréquences de translocation des oligosaccharides d'acide hyaluronique en fonction du degré de polymérisation dans une solution tampon HEPES 5 mM, KCl 1 M, pH 7,5, $\Delta V = 70$ mV. ....	121
Figure 76 : (A) Superposition des histogrammes des durées d'événements correspondant à l'hexa- (en vert), octa- (en bleu) et décasaccharide (en rouge) de l'acide hyaluronique. (B) Evolution du temps de translocation le plus probable à travers un pore d'aérolysine, en fonction du degré de polymérisation de l'acide hyaluronique. Expériences faites dans KCl 1 M, 5 mM HEPES, pH 7,5. $\Delta V = 70$ mV. [12] ....	122
Figure 77 : Distribution des temps de passage de l'hexa- (dp 6) et du décasaccharide (dp 10) de l'acide hyaluronique mélangés dans une solution tampon HEPES 5 mM, KCl 1 M, pH 7,5. $\Delta V = 70$ mV. (A) Histogramme des durées d'événement du dp 6 seul (en vert, 1 mM) et du mélange dp 6 + dp 10 (en violet, 0,5 mM chacun). (B) et (C) Nuage de points du dp 6 seul (C) et du mélange dp 6 + dp 10 (B). [12] ....	123
Figure 78 : Spectres de masse de différentes solutions d'hexasaccharide de l'acide hyaluronique. Des zooms ont été faits autour de l'ion dichargé (à gauche) ou de l'ion trichargé (à droite). Les spectres (A), (B) et (C) correspondent à des solutions standards d'hexasaccharide à différentes concentrations tandis que les spectres (D) correspondent aux solutions des compartiments trans récupérées après les expériences. ....	125
Figure 79 : Droites de calibration donnant l'intensité relative en fonction de la quantité d'hexasaccharide pour l'ion (A) dichargé ou (B) trichargé. ....	126
Figure 80 : Disaccharide constitutif de l'héparine. ....	127
Figure 81 : Spectre MALDI de l'hexasaccharide d'héparine montrant la diversité des structures de cet oligosaccharide en solution. Les spectres ont été obtenus en mode réflectron, en polarité négative. La matrice utilisée est HABA/TMG <sub>2</sub> ajoutée au ratio 1/1 avec l'analyte. La tension d'accélération est de 20 kV et le pourcentage de grille est de 70%. Le délai d'extraction est de 300 nsec. ....	128
Figure 82 : Trace correspondant à un essai de translocation d'un oligosaccharide d'héparine DP 16, dans une solution tampon HEPES 5 mM, pH 7,5, KCl 1M, à une tension de 70 mV, à travers un pore d'aérolysine. ....	129
Figure 83 : Expériences menées dans une solution tampon HEPES 5 mM, KCl 4,5 M, avec une tension de 70 mV. (A) Trace obtenue avant l'ajout de molécule dans le compartiment cis. (B) Trace obtenue après ajout de 25 $\mu$ M d'héparine DP 16. ....	130

Figure 84 : Traces correspondant à un essai de translocation du décasaccharide de l'acide hyaluronique (100 $\mu$ M) à travers un pore d' $\alpha$ -hémolysine, dans une solution tampon HEPES 5 mM, KCl 1 M. ....	131
Figure 85 : Trace correspondant à l'analyse d'un décasaccharide de l'acide hyaluronique (100 $\mu$ M) à travers un pore d' $\alpha$ -hémolysine, dans une solution tampon HEPES 5 mM, KCl 1 M, avec une tension de 100 mV. T = 25 °C. ....	131
Figure 86 : Traces à différents temps de réaction enzymatique à travers un pore d' $\alpha$ -hémolysine. $\Delta V$ = 100 mV. ....	132
Figure 87 : Traces à différentes tensions correspondant à l'analyse d'un dp 6 d'héparine (25 $\mu$ M) à travers un pore d' $\alpha$ -hémolysine dans une solution tampon HEPES 5 mM, KCl 1 M, pH 7,5. ....	133
Figure 88 : Structure chimique du dermatane sulfate. La molécule peut être sulfatée en position 2-O de l'acide iduronique, 4-O-sulfatée et/ou 6-O-sulfatée sur la galactosamine. Une épimérisation peut également avoir lieu sur le carbone 5 de l'acide iduronique. ....	134
Figure 89 : (A) Trace montrant les événements de translocation du dermatane sulfate 5150 (100 $\mu$ M) à travers un pore d'aérolysine, dans une solution tampon HEPES 5 mM, KCl 1 M, pH 7,5. $\Delta V$ = 100 mV. (B) Histogramme des durées d'événements correspondants. ....	134
Figure 90 : Structure chimique du dextrane sulfate. ....	135
Figure 91 : Traces montrant la translocation de molécules de dextrane sulfate 8000 (100 $\mu$ M) à travers un pore d' $\alpha$ -hémolysine à différentes forces ioniques et pour deux différentes tensions (50 mV à gauche et 130 mV à droite). ....	136
Figure 92 : Evolution des fréquences en fonction de la tension appliquée avec une échelle (A) linéaire ou logarithmique à (B) 1 M, (C) 2 M, (D) 3 M ou (E) 4 M en KCl. Le dextrane sulfate est ajoutée en solution à 100 $\mu$ M. ....	137
Figure 93 : Evolution du taux de blocage de molécules de dextrane sulfate 8000 à différentes forces ioniques en fonction de la tension appliquée. En insert, zoom autour de taux de blocage compris entre 0,7 et 1. ....	138
Figure 94 : (A) Représentation schématique du clivage du peptide par l'enzyme avec les signaux électriques obtenus. (B) Traces à différents temps de réaction. (C) Histogramme des intensités des traces à chacun des temps de réaction associés. [2]. ....	145
Figure 95 : Principe de fonctionnement de la hyaluronidase sur l'acide hyaluronique. ....	146
Figure 96 : Mécanisme de fonctionnement des lyases (à gauche) et des hydrolases (à droite) sur un glycosaminoglycane [5]. ....	147
Figure 97 : Droite étalon reliant l'absorbance à la concentration en molécules. Cette droite a été tracée pour des solutions de différentes concentrations en hexasaccharide de l'acide hyaluronique. ....	149
Figure 98 : Analyse spectrophotométrique de la réaction de dépolymérisation de l'acide hyaluronique. En rouge, réaction enzymatique de l'acide hyaluronique (3 mg/mL) avec la hyaluronidase (224 unités) à 37 °C dans 0,1 M NaAc, 0,15 M NaCl, pH 5,2 et avec une dilution au 1/200 <sup>e</sup> . En bleu, réaction enzymatique de l'acide hyaluronique (0,75 mg/mL) par la hyaluronidase (112 unités) à 21 °C dans 800 $\mu$ L 0,1 M NaAc, 0,15 M NaCl mélangé à 200 $\mu$ L 4,5 M KCl, 5 mM HEPES, pH 7,5 et avec une dilution au 1/100 <sup>e</sup> . ....	150
Figure 99 : Absorbance mesurée à 37 °C en fonction de celle mesurée à 21 °C. ....	151
Figure 100 : Suivi enzymatique par spectroscopie UV pour différentes concentrations en substrat. La concentration en enzyme reste inchangée. ....	152
Figure 101 : Spectres de masse MALDI-TOF de l'acide hyaluronique après 30 minutes de réaction avec la hyaluronidase. ....	154
Figure 102 : Spectres de masse MALDI-TOF de l'acide hyaluronique après 1h30 de réaction avec la hyaluronidase. ...	154
Figure 103 : Spectres de masse MALDI-TOF de l'acide hyaluronique après 2h30 de réaction avec la hyaluronidase. ...	155
Figure 104 : Spectres de masse MALDI-TOF de l'acide hyaluronique après 3h30 de réaction avec la hyaluronidase. ...	155
Figure 105 : Spectres de masse MALDI-TOF de l'acide hyaluronique après 1h30 de réaction avec la hyaluronidase. Zoom autour des pics correspondant aux DP 6 à 10 pour l'échantillon après 1h30 de réaction. ....	156
Figure 106 : Traces correspondant au milieu réactionnel obtenu après 30, 300 et 1560 minutes de dépolymérisation enzymatique de l'acide hyaluronique par la hyaluronidase, dans une solution tampon NaAc 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 5,2, T = 37 °C. La détection nanopore est effectuée dans un mélange de 800 $\mu$ L de NaAc 0,1 M, NaCl 0,15 M et 200 $\mu$ L de HEPES 5 mM, KCl 4,5 M, à pH 7,5. ....	157
Figure 107 : (A) Histogramme des durées d'événements du milieu réactionnel après différentes durées de réaction avec la hyaluronidase. (B) et (C) Evolution de la durée (B) et de la fréquence (C) des événements en fonction de la durée de réaction enzymatique. [11] ....	158

Figure 108 : Exemples de traces à différents temps de réaction enzymatique conduite et suivie en temps réel dans le compartiment cis du système nanopore. L'étude est effectuée à travers un nanopore d'aérolysine, à une tension appliquée de 70 mV, dans une solution de 800 $\mu$ L de NaAc 0,1 M, 0,15 M NaCl, auxquels sont ajoutés 200 $\mu$ L de HEPES 5 mM, KCl 4,5 M, pH 7,5, T = 21 °C. [HA] = 0,75 mg/mL, [hyaluronidase] = 112 unités.....	159
Figure 109 : Suivi en temps réel de la réaction de dépolymérisation enzymatique de l'acide hyaluronique. (A) Superposition des histogrammes des durées d'événements. (B) et (C) Courbes d'évolution (B) du temps moyen de translocation des molécules et (C) de la fréquence des événements en fonction de l'avancée de la réaction enzymatique. [11] .....	161
Figure 110 : (A) Représentation hyperbolique de l'équation de Michaëlis-Menten. (B) Représentation de Lineweaver-Burk.....	163
Figure 111 : Cinétique enzymatique mesurée à différentes concentrations de substrat, l'acide hyaluronique dans une solution de 800 $\mu$ L de NaAc 0,1 M, NaCl 0,15 M et 200 $\mu$ L de HEPES 5 mM, KCl 4,5 M, à pH 7,5. $\Delta V$ = 70 mV. T = 21 °C. ....	164
Figure 112 : Représentations (A) de Michaëlis-Menten et (B) de Lineweaver-Burk. Ces deux représentations nous permettent de calculer les constantes associées à cette réaction enzymatique telles que la vitesse maximale de réaction ou la constante de Michaëlis $K_M$ . ....	165
Figure 113 : Traces à différents temps de réaction enzymatique à travers un pore d' $\alpha$ -hémolysine. ....	167
Figure 114 : Courbe d'évolution de la fréquence d'événements des molécules de l'acide hyaluronique (0,75 mg/mL) en fonction de la durée de réaction avec la hyaluronidase (112 unités), dans une solution de 800 $\mu$ L de NaAc 0,1 M, NaCl 0,15 M et 200 $\mu$ L de HEPES 5 mM, KCl 4,5 M, à pH 7,5. $\Delta V$ = 100 mV. T = 21 °C. ....	167
Figure 115 : Durées des événements en fonction de la durée de la réaction enzymatique dans une solution de 800 $\mu$ L de NaAc 0,1 M, NaCl 0,15 M et 200 $\mu$ L de HEPES 5 mM, KCl 4,5 M, à pH 7,5. $\Delta V$ = 100 mV. T = 21 °C. ....	168
Figure 116 : Gel d'électrophorèse permettant de vérifier l'activation de la proaérolysine pour former l'aérolysine. ....	176
Figure 117 : Spectres MALDI-TOF de (A) la proaérolysine et de (B) l'aérolysine après activation par la trypsine. ....	177
Figure 118 : (A) 3 cuves de 1,5 mL et (B) la cellule utilisées pour les expériences de translocation. Les flèches rouges représentent les deux compartiments cis et trans. ....	178
Figure 119 : Schéma du montage expérimental. Photos de (A) la cage de Faraday et des électrodes plongées dans la cellule et (B) la binoculaire utilisée et la cage de Faraday. Schéma (C) d'un pore d' $\alpha$ -hémolysine inséré dans une membrane lipidique et (D) des 2 compartiments dans lesquels sont plongées les électrodes. ....	179
Figure 120 : Structure moléculaire du diphytanoyl-phosphatidylcholine. ....	180
Figure 121 : Exemple de traces (A et C) avant ou (B et D) après application du filtre médian de taille 5. ....	182
Figure 122 : (A) Trace sur laquelle ont été placés les seuils de détection trouvés à l'aide de l'histogramme des intensités (B). ....	183
Figure 123 : (A) Trace caractéristique montrant des événements. (B) Zoom autour de temps plus faibles. $I_0$ représente le courant de pore ouvert, $I_b$ le courant de blocage, $T_i$ le temps inter-événements, et les $T_{bi}$ les durées de blocage.....	183
Figure 124 : (A) Calcul de la fréquence et (B) Histogramme des durées des événements. ....	184
Figure 125 : Colonne de dessalage PD MidiTrap G-10, GE Healthcare, utilisée ici pour séparer les oligosaccharides de plus de 700 g/mol des sels présents en solution. ....	185
Figure 126 : Kits de dialyse utilisés pour dessaler les échantillons prélevés dans le compartiment trans de la cellule nanopore.....	185
Figure 127 : Spectres MALDI-TOF correspondant à (A et B) l'hexasaccharide et au (C et D) décasaccharide de l'acide hyaluronique, récupérés après les analyses nanopore et après dialyse et lyophilisation. ....	188
Figure 128 : Fragmentation de l'ion dichargé m/z 576.66, à gauche à partir d'une solution d'un standard de l'hexasaccharide, à droite à partir de l'échantillon récupéré du compartiment trans.....	199
Figure 129 : Fragmentation de l'ion trichargé m/z 384.10, à gauche à partir d'une solution d'un standard de l'hexasaccharide, à droite à partir de l'échantillon récupéré du compartiment trans.....	200

---

# Liste des abréviations

---

$\alpha$ -HL	$\alpha$ -Hémolysine
AFM	Atomic Force Microscopy (Microscopie de Force Atomique)
DP	Degré de Polymérisation
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
HA	Acide Hyaluronique
GAG	Glycosaminoglycane
ESI	ElectroSpray Ionisation (Ionisation ElectroSpray)
MS	Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse)
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
PFT	Pore Forming Toxin
GlcA	Acide Glucuronique
GlcNAc	Galactosamine N-acétylée
IdoA	Acide Iduronique
GlcN	Galactosamine
Hexa	Hexasaccharide
Octa	Octasaccharide
Déca	Décasaccharide
Courbe IV	Courbe Intensité/Potentiel
NaAc	Acétate de Sodium



---

## Introduction générale

---





Récemment, de nombreuses études ont été consacrées à l'utilisation de nanopores (des nanostructures de taille nanométrique comparable à celle des molécules) pour manipuler des macromolécules biologiques à l'échelle d'une molécule unique et analyser leur structure, leur séquence, leur dynamique et leurs interactions. On utilise le fait que les nanopores confinent les macromolécules à une échelle très petite et permettent d'une part une manipulation précise des positions et des forces en jeu, et d'autre part une détection relativement facile des actions effectuées. Cette détection est principalement électrique : on mesure la chute de conductivité induite par la présence d'une molécule dans le nanopore utilisé.

Une des applications les plus prometteuses de cette technique est le séquençage ultrarapide des molécules d'ADN (séquençage « de 4<sup>ème</sup> génération »). Les travaux effectués au laboratoire ont montré qu'on pouvait également appliquer les nanopores à l'étude du dépliement et du repliement des protéines.

Cette thèse est consacrée à l'utilisation des nanopores pour l'analyse des polysaccharides. Elle constitue un nouvel axe de recherche pour le laboratoire. Les compétences de deux équipes du LAMBE ont été mobilisées pour ces travaux : l'équipe nanopore, dirigée par Juan Pelta et rassemblant Laurent Bacri et Jérôme Mathé, et l'équipe d'analyse de polysaccharides par spectrométrie de masse dirigée par Régis Daniel.

Les polysaccharides font partie des molécules les plus hétérogènes. Leur analyse est donc plus complexe. Les techniques habituelles d'analyses des polysaccharides ne révèlent qu'une moyenne des populations en solution. Il n'est donc pas possible d'analyser toutes les variétés interindividuelles présentes en solution, qui sont pourtant la source de l'activité biologique des polysaccharides. C'est pourquoi le développement de nouveaux types d'analyses à l'échelle de la molécule unique est nécessaire, en plus des méthodes plus anciennes que sont l'AFM ou les pinces optiques.

L'héparine, un polysaccharide de la famille des glycosaminoglycanes, est très importante dans le domaine thérapeutique pour ses propriétés anticoagulantes. Ce polysaccharide est hautement sulfaté, cependant, la disposition de ces groupements sulfates n'est pas homogène. Les groupements sulfates se trouvent répartis en différents domaines le long des chaînes, pour former des domaines très sulfatés, des domaines non sulfatés, ainsi que des domaines intermédiaires, moyennement sulfatés. Cette thèse a démarrée avec comme objectif à terme l'adaptation de la technique d'analyse par nanopore à la discrimination des positions des différents domaines de sulfatation sur les polysaccharides d'héparine.

Avant d'étudier ces polysaccharides d'héparine, nous nous sommes intéressés à l'acide hyaluronique, également de la famille des glycosaminoglycanes, mais qui ne possède aucun groupement sulfate. Sa charge est apportée uniquement par des groupements carboxyliques. L'absence de groupement sulfate diminue très fortement la complexité structurale de l'acide hyaluronique par rapport à celle de l'héparine.

Cette thèse est articulée autour de quatre parties. La première décrit l'état de l'art sur l'étude des polysaccharides par différentes techniques expérimentales à l'échelle de la molécule unique, comme les pinces optiques ou magnétiques, ou la microscopie de force atomique. Puis, nous détaillons l'utilisation des nanopores et leurs applications à la détection des biomolécules.

Dans la deuxième partie, nous présentons les résultats obtenus pour l'analyse d'oligosaccharides de l'acide hyaluronique, d'héparine, du dermatane sulfate et du dextrane sulfate, à travers deux canaux protéiques (aérolysine et  $\alpha$ -hémolysine). Nous mettons en évidence des différences de comportements de ces deux pores vis-à-vis des oligosaccharides, ainsi que des différences de conformations entre ces

oligosaccharides, entraînant différentes « signatures » électriques caractéristiques. Nous prouvons également la translocation effective des oligosaccharides à travers le nanopore, d'un compartiment à l'autre, pour la première fois, à l'aide d'une méthode de spectrométrie de masse.

Le troisième chapitre de ma thèse traite de l'une des applications de la technique de détection par nanopore : le suivi d'une réaction enzymatique dont la détection se fait à l'échelle de la molécule unique. Cette réaction est tout d'abord suivie par une méthode d'analyse plus classique, par spectroscopie UV-Visible, afin d'effectuer une comparaison entre ces deux techniques. Nous montrons qu'il est possible de suivre une réaction enzymatique par nanopore, ainsi que de déterminer les paramètres cinétiques de cette réaction à l'échelle de la molécule.

Nous rassemblons enfin dans un quatrième chapitre, la description des matériels et des méthodes utilisés pendant cette thèse, avant de conclure sur les résultats des travaux de recherches exposés. Nous terminons par la suggestion de quelques pistes de perspectives d'expériences à mener ou à approfondir.

---

# I. Chapitre 1 : Analyse à l'échelle de la molécule unique : Polysaccharides et Nanopores

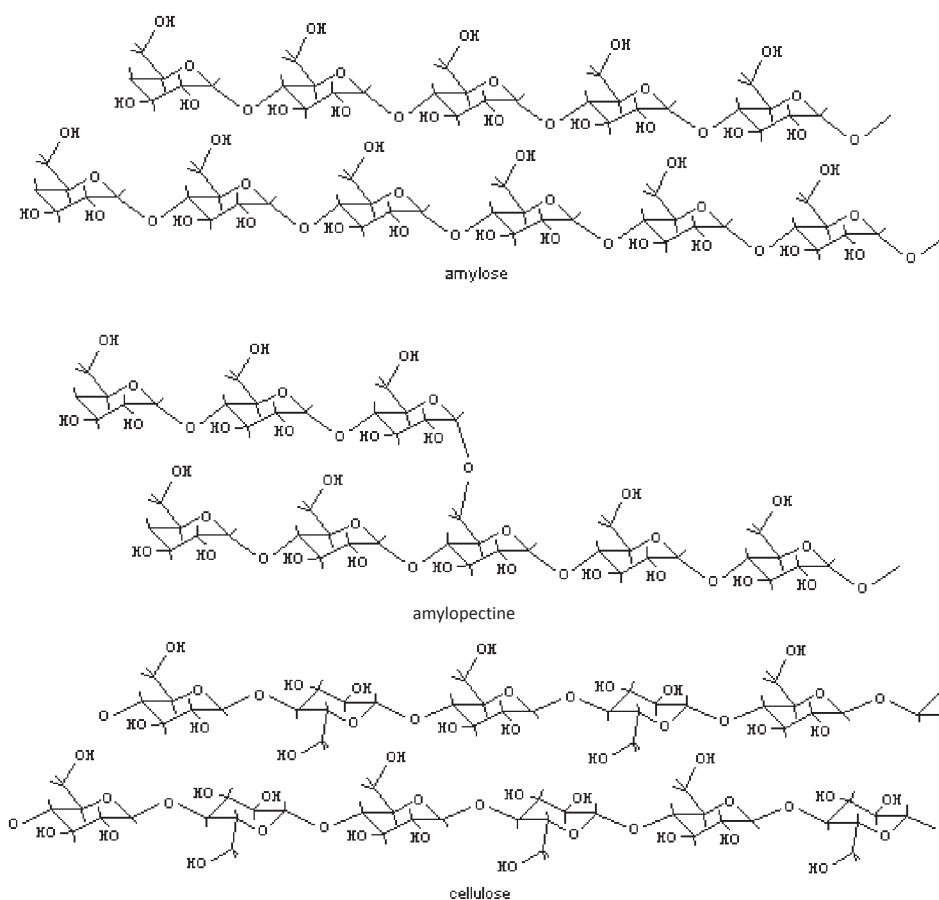
---

<i>I.1. Les glycosaminoglycanes, une classe spéciale de polysaccharides. Enjeux</i>	<i>25</i>
<i>I.2. Les principales méthodes d'analyse de biomolécules à l'échelle de la molécule unique</i>	<i>30</i>
<i>I.3. Applications des techniques d'analyse à l'échelle de la molécule unique à l'étude des biomolécules</i>	<i>36</i>
<i>I.4. Les nanopores</i>	<i>52</i>
<i>I.5. Nanopores et polysaccharides</i>	<i>90</i>
<i>I.6. Conclusion</i>	<i>91</i>
<i>I.7. Références bibliographiques</i>	<i>92</i>



## I.1. Les glycosaminoglycanes, une classe spéciale de polysaccharides. Enjeux

Les polysaccharides représentent une classe majeure de macromolécules biologiques, présentes dans tous les systèmes vivants : plantes, algues, bactéries, cellules animales. Ce sont de longues chaînes de monosaccharides (la plus petite unité des carbohydrates) liés les uns aux autres par des liaisons glycosidiques. Ils sont linéaires ou branchés, constitués du même motif de répétition ou d'un enchaînement de différents motifs.



**Figure 1 : Structure de quelques polysaccharides, l'amidon, composé d'amylose et d'amylopectine, et la cellulose. [1]**

La complexité structurale des polysaccharides entraina la création de plusieurs types de classifications, basées sur leur composition en monomères, leur structure ou encore la fonction biologique qu'ils assurent. Ces différences de structures donnent aux polysaccharides des propriétés distinctes de gélification, de viscosification ou d'émulsification dans le domaine alimentaire ainsi que des propriétés thérapeutiques très variées. C'est pourquoi de nombreuses études, théoriques et expérimentales, ont été consacrées à l'étude des polysaccharides, en utilisant de nombreuses techniques analytiques telles que la spectrométrie de masse, la résonance magnétique nucléaire (RMN), la diffraction de rayons X, la spectroscopie infrarouge, la microscopie électronique à transmission, ou encore la diffusion de lumière.

On classe les polysaccharides en deux catégories selon leur fonction biologique : les polysaccharides de structure et les polysaccharides de réserve. La cellulose constituant la paroi cellulaire végétale, les peptidoglycans constituant la paroi cellulaire bactérienne et les tissus conjonctifs animaux appartiennent à la première catégorie. L'amidon (composé d'amylose et d'amylopectine dont la structure est représentée sur la [Figure 1](#)) stockant de l'énergie dans les plantes et le glycogène pour les cellules animales appartiennent à la seconde. Dans le domaine microbien, certains polysaccharides entrant dans la composition de la capsule de certaines bactéries, sont également impliqués dans la formation de biofilms, la corrosion ou la propagation d'infections [2, 3]. Dans les cellules eucaryotes, les polysaccharides forment des récepteurs à leur surface, impliqués dans la reconnaissance et l'adhésion cellulaire [4].

Au cours de cette étude, nous nous concentrons sur une classe de polysaccharides, les glycosaminoglycans, dont le rôle et la structure sont détaillés ci-dessous.

### **I.1.1. Les glycosaminoglycans : rôle et structure**

Les glycosaminoglycans (GAGs) représentent une famille de polysaccharides principalement sulfatés, constitués de répétitions d'unités disaccharidiques s'assemblant en chaînes linéaires. Ils sont en général rattachés à un corps protéique (formant une macromolécule appelée « protéoglycane ») lié à la surface des cellules ou au sein de la matrice extracellulaire dont ils sont l'une des composantes majeures. Ils influencent plusieurs processus physiologiques tels que l'adhésion cellulaire, l'angiogénèse, la morphogénèse, l'inflammation, l'hémostase, les processus métastatiques, entre autres [5-7].

Les GAGs sont hautement hétérogènes et contiennent des variations structurales entre les différentes chaînes et également au sein d'une même chaîne. Les raisons pour cela sont multiples : les polysaccharides sont des produits secondaires de gènes qui sont synthétisés en fonction des besoins. Contrairement aux autres biomolécules dont la structure terminale est définie avant même leur biosynthèse, la structure de base du glycosaminoglycane est d'abord produite, puis, celle-ci va être modifiée par de multiples enzymes, de façon à maximiser leur fonction selon les besoins et lorsque cela sera nécessaire [8].

Chaque polysaccharide acquiert une structure bien spécifique afin d'interagir avec une protéine ciblée, afin de réguler certains processus physiologiques. On peut citer le complexe formé par l'héparine et l'antithrombine III, inhibant l'action de la thrombine, permettant de limiter la coagulation du sang [9]. La découverte d'autres complexes protéine-GAG, et donc de nouveaux traitements thérapeutiques, passe donc nécessairement par une meilleure compréhension des structures de ces GAGs, la majorité des maladies ayant un aspect impliquant un GAG [7].



Figure 2 : Structure du pentasaccharide d'héparine permettant la formation du complexe Antithrombine III - Héparine. Les groupements encadrés d'un trait continu sont ceux nécessaires à la formation de ce complexe, tandis que ceux encadrés en pointillés augmentent l'affinité de liaison sans toutefois être indispensables. [9]

Les glycosaminoglycanes sont répartis en quatre classes majeures, l'héparane sulfate et l'héparine, la chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate et le kératane sulfate [10], auxquels s'ajoute l'acide hyaluronique, le seul glycosaminoglycane totalement dépourvu de groupement sulfate (Figure 3). Chaque disaccharide de ces molécules (leur monomère constitutif) est composé d'un acide uronique (le  $\beta$ -D-glucuronate ou le  $\alpha$ -L-iduronate) associé à une hexosamine (la N-acetylglucosamine GlcNAc ou la N-acetylgalactosamine GalNAc) [11]. Ce sont de longues chaînes de polysaccharides, de diverses longueurs (entre 10 et 200 disaccharides en général) et dont le profil de sulfatation est également variable le long des chaînes. De plus, le cycle pyranose de l'acide iduronique possède une flexibilité conformationnelle, existant sous ses différentes formes chaise en équilibre avec sa forme bateau.

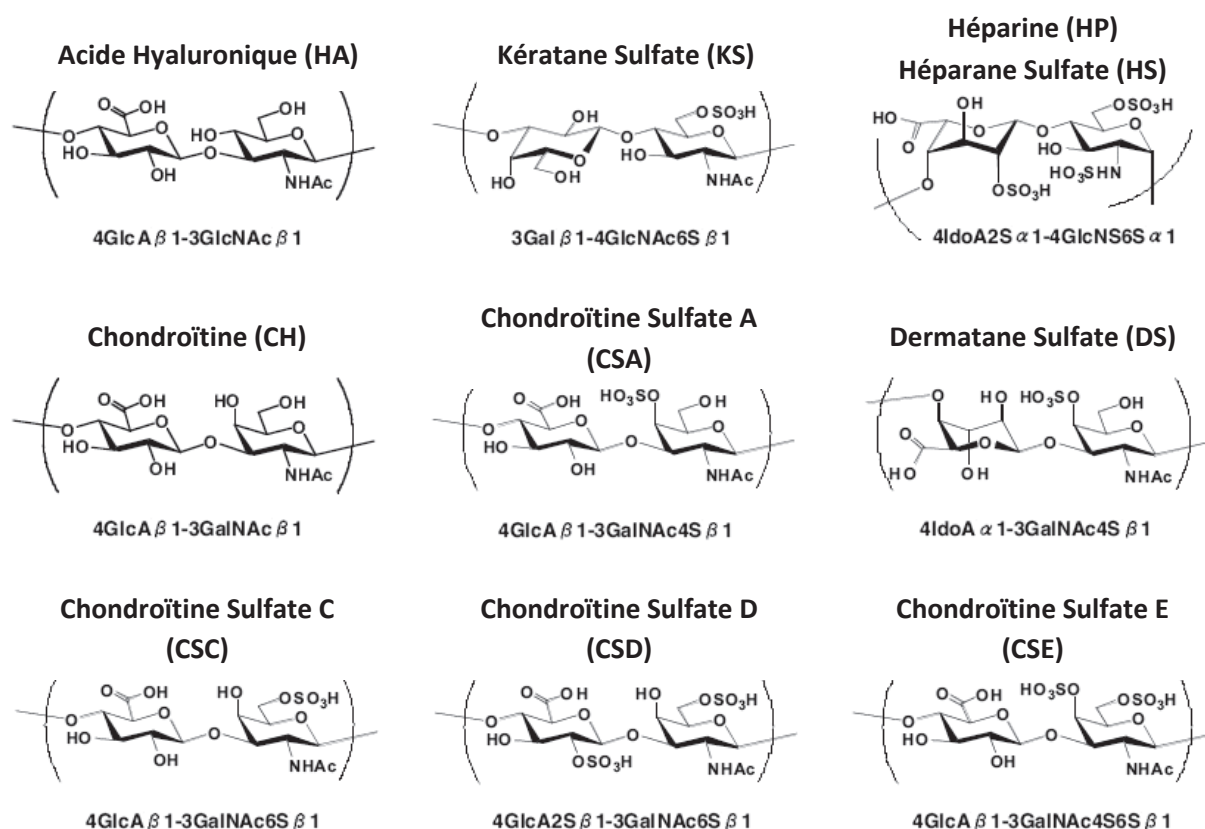


Figure 3 : Structures chimiques des différents glycosaminoglycanes. [5]

Le profil de sulfatation et le nombre d'isomères varient énormément d'une molécule à une autre, y compris entre des molécules de la même famille [10, 12]. Il existe 256 séquences de sulfatations différentes pour un tétrasaccharide de chondroïtine sulfate tandis qu'un tétrasaccharide d'héparine en aura plus de

2000 [10]. Tous ces isomères ne sont cependant pas forcément observables *in vivo*, tous n'ayant jusque là pas encore été identifiés. La répartition des groupements sulfates le long d'une chaîne n'est pas totalement aléatoire. On observe une certaine structuration en domaines très sulfatés, peu sulfatés ou pas du tout sulfatés. Ces variations spatiales des séquences ont amené à penser que les glycosaminoglycanes renferment des informations sous la forme d'un « code de sulfatation ». La résolution de ce code et de ses mécanismes d'action permettrait une meilleure compréhension des divers phénomènes biologiques et pourrait apporter de nouvelles avancées dans le domaine thérapeutique.

Ce sont tous ces paramètres, la distribution de charges et des groupements sulfate, les différentes séquences ainsi que les différentes conformations des cycles pyranose, qui donnent aux glycosaminoglycanes cette très riche diversité structurale.

### I.1.2. Techniques d'analyse des polysaccharides

Les méthodes habituellement utilisées pour étudier la structure des polysaccharides sont la résonance magnétique nucléaire (RMN), la diffraction des rayons X (DRX), la diffusion de lumière, la microscopie électronique à balayage (SEM) ou encore la microscopie électronique à transmission (TEM) [13]. La spectrométrie de masse est de plus en plus employée [5, 12]. La Figure 3 montre les fortes similitudes entre les différents glycosaminoglycanes. Certaines molécules possèdent la même composition chimique mais sont différents de par leur structure. Les liaisons glycosidiques, liaisons reliant les différents disaccharides entre eux, peuvent également être différentes. A l'inverse, certaines molécules possèdent les mêmes liaisons glycosidiques et la même conformation mais les substitutions sont différentes. Compte tenu de cette diversité, ces molécules sont très difficiles à analyser par les méthodes actuelles.

La RMN du proton ( $^1\text{H}$ ) ou du carbone ( $^{13}\text{C}$ ) sont les techniques RMN les plus fréquentes pour l'analyse des glycosaminoglycanes. Cependant, les spectres obtenus sont complexes et difficiles à interpréter si la molécule à analyser est très hétérogène ou s'il s'agit d'un mélange de différents glycosaminoglycanes (par exemple un mélange d'oligosaccharides d'acide hyaluronique et d'héparine, voire des mélanges plus complexes encore).

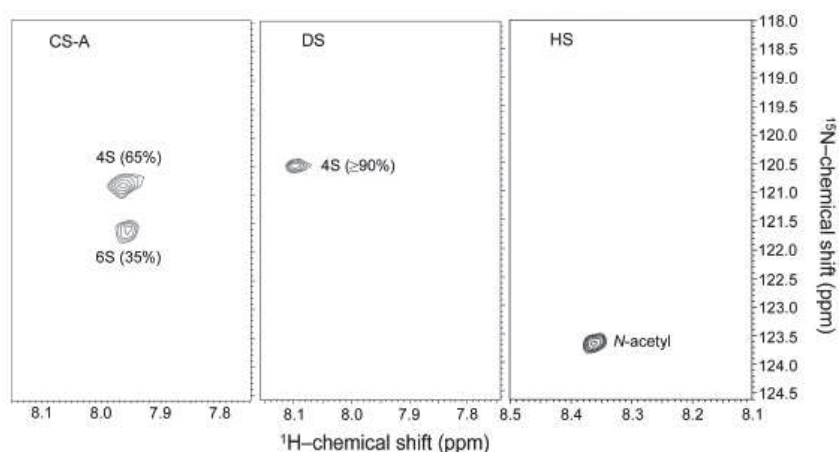


Figure 4 : Analyses RMN 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de trois GAGs, la chondroïtine sulfate A, le dermatane sulfate et l'héparane sulfate.



Vitor H. Pomin *et al.* [6] ont utilisé la RMN de l'azote ( $^{15}\text{N}$ ) plutôt que la RMN du carbone ( $^{13}\text{C}$ ), couplée à la RMN  $^1\text{H}$ , pour améliorer la caractérisation des GAGs. Les principales limitations de cette méthode sont la faible sensibilité (l'abondance de l'azote 15 n'étant que de 0,37 %) et le faible rapport gyromagnétique de l'azote 15. Cette méthode a permis la différenciation de certains GAGs comme le dermatane sulfate et l'héparane sulfate (Figure 4).

L'inconvénient des études de structure et de séquence des glycosaminoglycanes est leur lenteur et le fait qu'elles nécessitent généralement plusieurs étapes. Après des étapes de digestion et de séparation des molécules, l'identification des sites de sulfatation est obtenue par analyses HPLC et/ou par une combinaison d'analyses RMN et de spectrométrie de masse. L'utilisation de plusieurs méthodes d'analyse couplées est indispensable pour obtenir le plus d'informations structurales possibles. Des incertitudes existent en cas de digestion incomplète par exemple. De plus, de petites différences entre deux molécules (comme entre la chondroïtine sulfate C et le dermatane sulfate) sont très difficiles à observer, particulièrement dans le cas d'un mélange.

La spectrométrie de masse est une technique de choix pour analyser les GAGs. Le FAB-MS (Fast Atom Bombardment – Mass Spectrometry) a été la méthode la plus utilisée par le passé car la méthode d'ionisation utilisée produit de nombreux fragments et permet d'obtenir de nombreuses informations. Cependant, des fragmentations indésirables (clivage glycosidique ou encore désulfatation) surviennent durant le processus d'ionisation et elle est de moins en moins utilisée. De plus la quantité d'échantillons nécessaire est plus élevée que pour les méthodes d'ionisation plus récentes comme l'ESI (ElectroSpray Ionisation) ou le MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) [5].

L'ESI est fréquemment utilisée pour l'analyse de GAGs car c'est la méthode d'ionisation la plus douce, permettant d'ioniser les molécules sulfatées sans perte de sulfate. Elle permet également de produire des ions multi-chargés ce qui est utile pour détecter des molécules dont la taille dépasse la limite de détection du spectromètre. Cela nécessite cependant une grande attention dans le cas d'analyses de longues macromolécules, car l'attribution des pics aux différents fragments est extrêmement difficile. De nombreux fragments possèdent différents états de charge.

Le MALDI est également utilisé pour l'analyse des GAGs mais son utilisation est moins fréquente que celle de l'ESI car il entraîne fréquemment une perte des groupements sulfate. Le MALDI demeure une méthode d'analyse à haute sensibilité pour les GAGs non sulfatés tels que l'acide hyaluronique [5].

Des méthodes de spectrométrie de masse plus sophistiquées permettent de remonter à la structure globale du polysaccharide, c'est le cas de la technique de spectrométrie de masse en tandem  $\text{MS}^n$  [12]. Cette spectrométrie de masse multi-étape permet de fragmenter chacun des ions observés et de relier sans ambiguïté les ions fragments obtenus à la molécule d'origine. Sans ces fragmentations successives, il ne serait pas possible d'analyser et de différencier plusieurs ions, par exemple un dermatane sulfate d'une chondroïtine sulfate tous deux monosulfatés, chacun présentant un pic aux alentours de  $m/z$  458. Cependant le spectre  $\text{MS}^2$  obtenu est complexe, comme le montre la Figure 5, correspondant à un seul disaccharide monosulfaté. Ces méthodes fonctionnent bien lorsque la molécule n'est que peu sulfatée, tandis que la détermination des sites plus sulfatés demeure un problème.

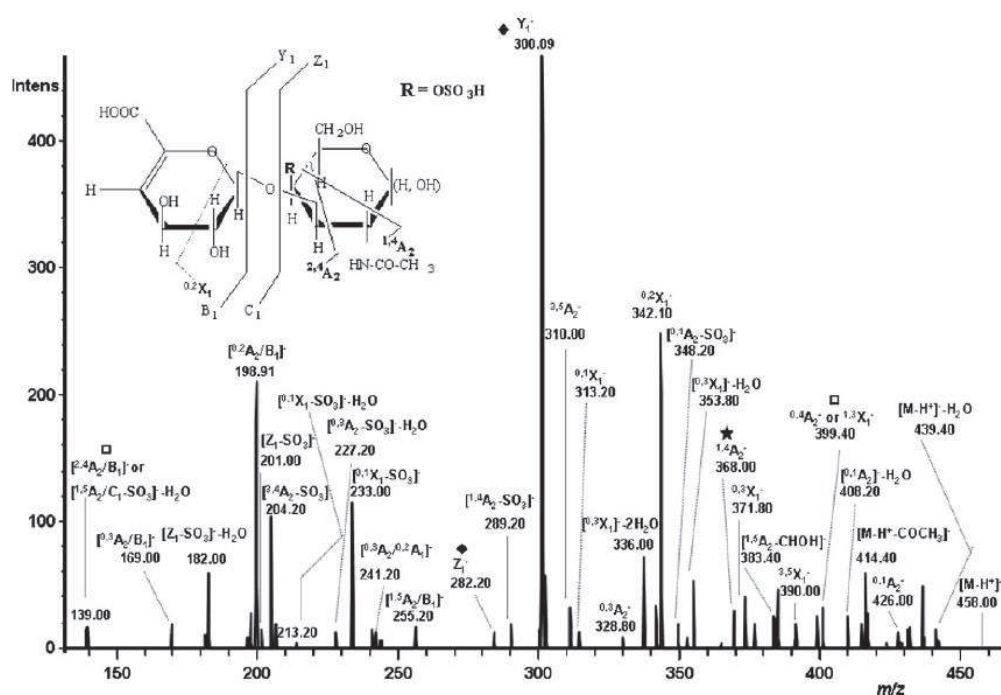


Figure 5 : Spectre de masse MS<sup>2</sup> d'un disaccharide monosulfaté du dermatane sulfate obtenu par ESI-MS. Dans l'insert en haut à gauche se trouve la structure chimique de ce disaccharide monosulfaté. [12]

Lorsqu'une molécule analysée n'existe que dans une seule et unique conformation et sous une seule forme, l'analyse fournira des informations exactes de cette molécule. Cependant, si la molécule existe sous plusieurs conformations et sous plusieurs formes, et si la solution à analyser contient un mélange de molécules, les données obtenues ne reflèteront pas toutes les conformations existantes mais une moyenne. C'est le cas pour les polysaccharides qui existent sous plusieurs conformations (l'acide uronique d'un polysaccharide peut par exemple se trouver dans sa conformation chaise ou dans sa conformation bateau) et avec différents degrés de sulfatation.

Le fait de ne déterminer qu'une structure moyenne constitue l'un des inconvénients majeurs des méthodes citées ci-dessus. Pour résoudre ce problème la seule façon est de recourir à des techniques d'analyse à l'échelle de la molécule unique. Plusieurs d'entre elles ont été développées et sont discutées par la suite.

## I.2. Les principales méthodes d'analyse de biomolécules à l'échelle de la molécule unique

Ces dernières années, de nombreuses méthodes d'analyse à l'échelle nanométrique ont vu le jour. A l'échelle de la molécule unique, les informations obtenues permettent d'analyser chacune des conformations possibles d'une molécule et non plus uniquement d'en observer la moyenne. Ceci est particulièrement intéressant pour les analyses de polysaccharides, possédant de nombreuses conformations en solution. Les différentes techniques ayant été développées sont décrites dans les parties

suivantes, avec un résumé de leur principe de fonctionnement. Les expériences de spectroscopie de fluorescence sont plus anciennes que les autres, cependant, leur utilisation en analyse de molécule unique n'a commencé que depuis les années 1990.

Technique utilisée	AFM	Pincés		Nanopores : translocation de molécules uniques
		Optiques	Magnétiques	
Date de découverte	1985	1986	1992	1996

**Tableau 1** : Date de découverte de différentes techniques utilisées pour les analyses en molécule unique.

### I.2.1. Microscopie de fluorescence

En microscopie de fluorescence, l'échantillon à analyser est lui-même la source de lumière. Cette méthode est basée sur la détection de la lumière émise par certaines molécules lorsqu'elles sont soumises à une irradiation. En général, ces méthodes reposent sur des moyennes mais quelques travaux menés par P. Didier au Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie de l'Université de Strasbourg ou encore E. Margeat au Centre de Biochimie Structurale de Montpellier [14-16] ont été effectués à l'échelle de la molécule unique. Différentes techniques sont utilisées comme le FRET ou la FCS décrites ci-dessous.

Le FRET (**F**luorescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfer) exploite le transfert d'énergie de l'état d'un fluorophore 1 (donneur) vers un autre fluorophore 2 (accepteur) lorsque ce couple de fluorophores est à une distance comprise entre 10 et 100 Å l'un de l'autre. Cette condition de proximité permet de donner des informations sur la relation spatiale de ces molécules. Le donneur, dans son état électronique excité, peut transférer son énergie à une autre molécule dite accepteur. Cette technique est très sensible à la distance entre les deux fluorophores ainsi qu'à leur orientation spatiale. Tout changement de l'un de ces deux paramètres entraîne une modification du signal FRET. Ainsi, les interactions protéine-protéine ou protéine-ADN ainsi que les changements conformationnels des protéines, ou repliement de l'ADN, peuvent être analysés.

La Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (**F**luorescence **C**orrelation **S**pectroscopy, FCS) mesure les fluctuations de l'intensité de fluorescence des molécules analysées. Elle est principalement utilisée pour étudier la diffusion des molécules en solution due au mouvement brownien. La concentration des molécules étudiées est de l'ordre du picomolaire. Cette technique permet également de suivre le parcours biologique de certaines molécules dans des cellules ou dans les organes. Les informations pouvant être retirées de cette méthode sont le coefficient de diffusion, le rayon hydrodynamique, la concentration moyenne des particules en solution ou encore les constantes cinétiques pour les réactions chimiques.

### 1.2.2. Pinces optiques et magnétiques

La méthode des pinces optiques est une méthode très précise permettant la manipulation de particules sans les détériorer. Introduite pour la première fois en 1986 par A. Ashkin *et al.* [17], elle repose sur un faisceau de lumière, fortement focalisé, diffusé en direction d'une bille diélectrique, créant un gradient de champ électrique attractif. La molécule à étudier est ensuite approchée de la bille, ainsi piégée au centre du faisceau, ou mise à son contact à l'aide d'anticorps. Le mouvement de la bille est enregistré puis analysé.

Deux conditions sont nécessaires pour que l'expérience puisse fonctionner. La première concerne le milieu dans laquelle va se trouver la molécule. Il faut que l'indice de réfraction du milieu soit inférieur à celui de la cible, pour qu'elle puisse être attirée vers le centre du piège. L'autre caractéristique est l'intensité du faisceau laser. Il doit être de faible puissance (en général entre 25 mW et 1 W) pour éviter un trop grand dégagement de chaleur, ce qui aurait pour conséquence de détruire (partiellement ou totalement) l'échantillon ou de déclencher des réactions photochimiques. Il faut également que la cible absorbe le moins possible à la longueur d'onde du faisceau laser (généralement comprise entre 700 et 1000 nm) pour atténuer au maximum ce dégagement thermique.

Cette méthode a permis l'étude du déplacement de certaines molécules telles que la kinésine et la myosine lors de leur déplacement le long des microtubules ou des microfilaments d'actine du cytosquelette [18-20]. Plus récemment, la force générée par une ARN polymérase a également pu être mesurée lors de son avancée sur un brin d'ADN, effectuant la transcription d'un brin d'ARN [21]. Une autre application des pinces optiques est la mesure des propriétés mécaniques de composants de la cellule comme le cytosquelette de globules rouges [22], les microtubules [23], des filaments d'actine [24] ou encore de longs brins d'ADN [25]. Plus généralement les techniques de pinces optiques ou magnétiques ont été parmi les premières techniques permettant d'étudier en direct le fonctionnement de certaines enzymes.

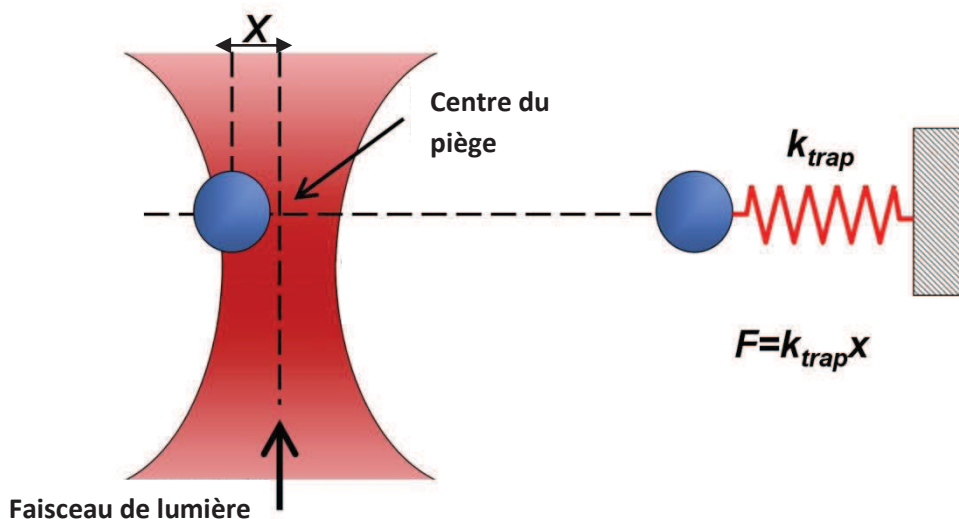
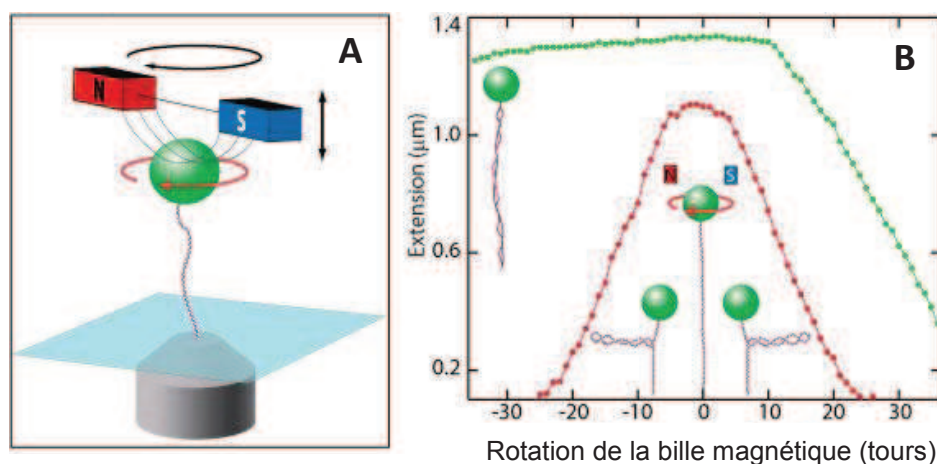


Figure 6 : Représentation des expériences de pinces optiques. La bille diélectrique est représentée en bleu. La distance  $X$  correspond à l'écartement de la bille diélectrique du centre du faisceau de lumière. [26]

Les pinces magnétiques utilisent le même principe que les pinces optiques, cependant, la bille n'est plus piégée par un faisceau de lumière mais par un champ magnétique. Ainsi, les molécules ciblées sont des particules magnétiques, de taille comprise entre 0,5 et 5  $\mu\text{m}$ . Lorsque l'échantillon à étudier n'est pas une particule magnétique, il est attaché à une bille super-paramagnétique (dont l'aimantation apparaît comme nulle en l'absence de champ magnétique appliqué). L'échantillon est attaché à la fois sur la bille et à une surface fixe, comme illustré sur la [Figure 7, A](#). L'échantillon (ou la bille) est déplacé à l'aide d'un champ magnétique, créé par au moins deux bobines. La présence de ces deux aimants est nécessaire pour gérer à la fois une force et des rotations de l'échantillon (Cf. [Figure 7, A](#)) tandis que la présence d'un seul aimant va uniquement permettre d'appliquer une force attractive sur la particule [27]. Ceci va entraîner un déplacement, un étirement ou encore une torsion de la molécule étudiée permettant ainsi d'observer son comportement à l'aide d'une microcaméra. Les pinces magnétiques ont été utilisées pour la mesure de la topologie de molécules individuelles d'ADN [28, 29] et pour l'étude de topoisomérases [30-33]. Revyakin *et al.* ont par exemple étudié, en utilisant les pinces magnétiques, la dépendance de l'initiation de la transcription sur la densité de l'ADN hautement condensé [34].

Ces deux méthodes (pinces optiques ou magnétiques) reposent sur le même concept, la micromanipulation d'objets uniques reliés à une bille (diélectrique pour les pinces optiques ou super-paramagnétique pour les pinces magnétiques). Dans les deux cas, l'application d'une force permet de modifier sélectivement les étapes d'un cycle de réaction et de mesurer l'extension de la molécule sous l'action de cette force. Les forces générées sont de l'ordre du piconewton mais les pinces magnétiques permettent de descendre également jusqu'à des forces de l'ordre du femtonewton. De plus, la méthode des pinces magnétiques ne souffre pas du problème de l'échauffement thermique pouvant apparaître avec les pinces optiques. L'inconvénient réside cependant dans le fait que lorsque l'aimant est éloigné de la particule, la force appliquée chute rapidement. Il faut alors utiliser des électroaimants plus gros, qui fourniront un plus important champ magnétique, ce qui permettra de ralentir et diminuer la perte de force appliquée lors de l'éloignement de la molécule.

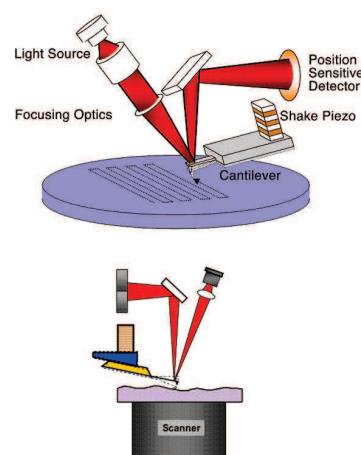
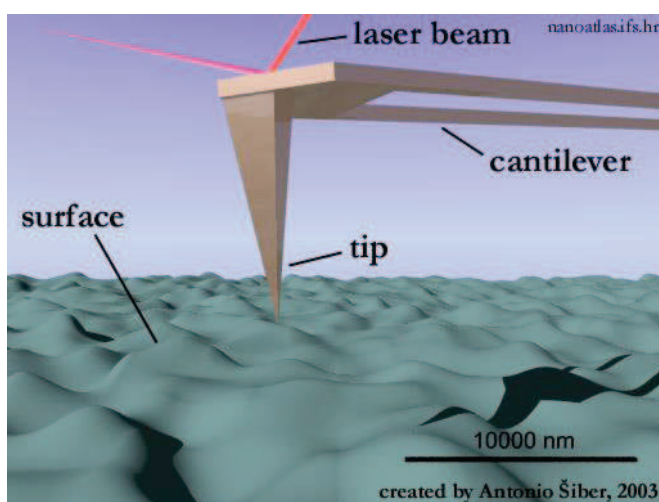


**Figure 7 :** (A) Schéma représentatif d'une expérience avec des pinces magnétiques. L'aimant se déplace sur l'axe vertical ou opère une rotation sur lui-même pour entraîner un déplacement de la molécule. (B) Extension en  $\mu\text{m}$  de la molécule en fonction du nombre de rotations de la bille aimantée. [27]

### 1.2.3. AFM

La Microscopie de Force Atomique (ou AFM pour **A**tomic **F**orce **M**icroscopy) est un type de microscopie à très haute résolution, inférieure au nanomètre, permettant de détecter la topographie de la surface d'un échantillon. Cette méthode, décrite en 1985 par G. Binnig, F. Quate et C. Gerber [35], utilise une sonde locale (généralement en silicium ou en nitrure de silicium) se déplaçant au dessus d'un échantillon. Trois différents modes de fonctionnements sont disponibles, modes contact, contact intermittent (ou « tapping ») et sans contact (ou « modulation de fréquence »), en fonction des échantillons à analyser et des paramètres que l'on veut obtenir. Seul le mode contact permet d'obtenir une résolution atomique, donc à l'échelle de la molécule unique.

Le système est constitué d'une pointe (la sonde, d'un rayon de courbure compris entre 2 et 50 nm) attachée à l'extrémité d'un microlevier. Un faisceau laser se réfléchit sur le microlevier, au dessus de la pointe, vers un photodétecteur. Lorsque la sonde rencontre des différences de relief, le laser est dévié sur le photodétecteur, révélant des forces d'interactions entre la sonde et la surface, et donc la topographie de la surface. Les forces appliquées varient de 0,1 nN à 1  $\mu$ N. On peut ainsi faire une cartographie en trois dimensions de la surface.



**Figure 8 :** Schéma représentant le fonctionnement de l'AFM. On voit ici le microlevier avec sa pointe, la surface à analyser et le rayon laser.

L'AFM est une méthode d'analyse à l'échelle de la molécule unique, chaque analyse se faisant sur une seule molécule et non sur une population moyenne. Les échantillons étudiés peuvent indifféremment se trouver en solution ou à l'air libre pour pouvoir être analysés. De plus, ils ne nécessitent que peu de préparation ce qui leur permet d'être analysés dans les conditions physiologiques [13]. Cependant, deux problèmes techniques ralentissent le développement de cette méthode. Le premier provient de la pointe utilisée pour former les images. Toutes les pointes ne sont pas uniformes, ce qui entraîne des différences de résolution dans les images obtenues. Le second problème est dû à la pointe qui, en scannant la surface, tend à déplacer les biomolécules n'étant pas fermement attachées, risquant de les endommager ou de les déplacer en dehors de la surface à analyser [36]. Pour éviter ceci, les molécules doivent être fortement attachées afin de les empêcher de bouger mais pas trop non plus pour éviter de les dénaturer. Des



méthodes de greffage de récepteurs sur la pointe de l'AFM ont été mises au point pour pallier ce problème [37-39].

Principalement utilisée en tant qu'outil d'imagerie, la microscopie de force atomique permet également la mesure de forces d'interactions inter- et intramoléculaires. Le microlevier ne scanne plus la surface et ne se déplace plus que le long de l'axe perpendiculaire à l'échantillon. Des courbes montrant l'évolution de l'extension de la molécule en fonction de la force appliquée sont ainsi obtenues, renseignant sur la structure ou encore sur l'activité de la molécule étudiée. Il est également possible d'étudier la rupture des liaisons moléculaires, allant de la rupture de liaisons covalentes [40] à l'étude du dépliement de protéines [41] ou d'acides aminés [42]. Plus récemment, des expériences ont été effectuées pour étudier certaines réactions enzymatiques. Par exemple, Wiita *et al.* [43] ont déduit des changements conformationnels du substrat lors de sa catalyse enzymatique.

### 1.2.4. Les nanopores

La technique d'analyse des molécules à travers des nanopores est dérivée de celle du compteur Coulter [44]. Elle repose sur la détection des variations de courant ionique lors du passage d'un objet, d'une particule ou d'une molécule que l'on veut étudier, à travers un trou de très faible taille (entre 1 nm de diamètre pour les nanopores protéiques et plusieurs centaines de nanomètres pour les nanopores artificiels). Ce trou nanométrique se trouve dans une membrane isolante séparant deux compartiments remplis d'une solution ionique. L'application d'une différence de potentiel entre ces deux compartiments va engendrer l'apparition d'un courant de l'ordre du pA au nA, en fonction de la taille et des caractéristiques du nanopore utilisé pour l'expérience. Chaque particule traversant le pore entraîne une baisse plus ou moins importante du courant en fonction du rapport entre la taille de la particule et le diamètre du pore, les interactions particule / nanopore, le type de solution ionique, la température, le pH, ...

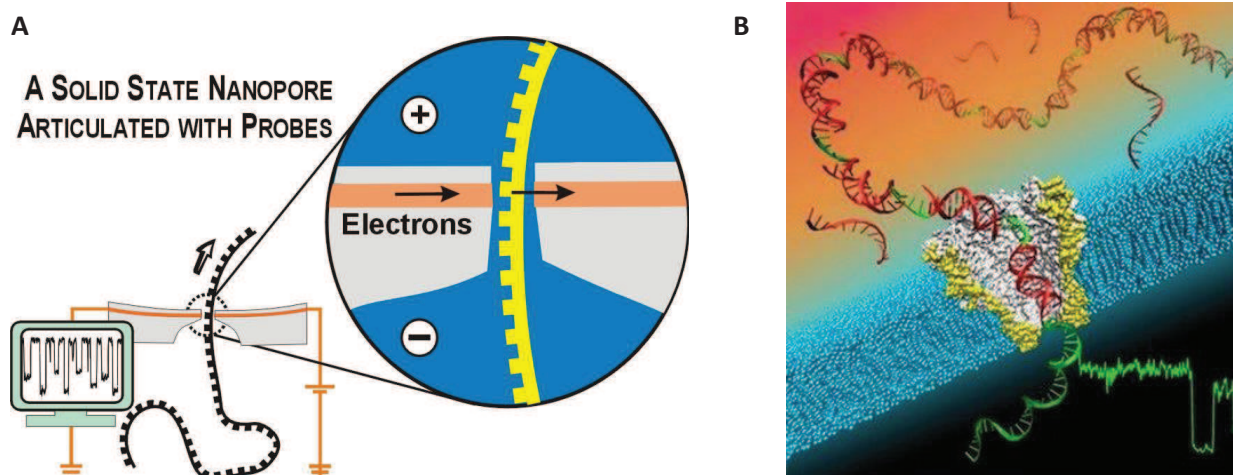


Figure 9 : Exemples d'expériences mettant en œuvre un polymère traversant un nanopore (A) artificiel [45] ou (B) protéique [46].

Les paramètres accessibles sont principalement la fréquence de passage des particules à travers le pore (dépendant de la concentration des particules en solution et des interactions particule / entrée du pore), la durée de passage des particules à travers le pore (fonction de la longueur des particules, des interactions entre les particules et l'intérieur du pore) et enfin le taux de blocage du pore (fonction du diamètre des particules traversant le pore). Cette technique est utilisée depuis la fin des années 1970 pour mesurer la conductivité des canaux ioniques étudiés [47, 48] ou pour en mesurer les diamètres internes [48, 49]. Kasianowicz et son équipe furent les premiers à exploiter ce système comme un moyen d'analyse de molécules simples brins d'ADN et d'ARN. Ils utilisèrent un canal biologique (l' $\alpha$ -hémolysine) inséré dans une bicouche lipidique [50].

### I.3. Applications des techniques d'analyse à l'échelle de la molécule unique à l'étude des biomolécules

Utiliser des méthodes d'analyse à l'échelle de la molécule unique telles que la microscopie de force atomique ou les pinces optiques, est particulièrement intéressant pour l'analyse des biomolécules que sont l'ADN [51, 52], les protéines [53-55] ou les polysaccharides [37, 56-59]. En effet, elles permettent à l'utilisateur de recueillir davantage qu'une information moyenne. Cependant, peu d'expériences ont été à ce jour consacrées à l'analyse des polysaccharides, sauf dans le cas de la microscopie de force atomique (AFM). L'AFM a été très utilisée pour observer des molécules d'ADN ou des protéines mais nous ne décrivons ici que les études concernant les polysaccharides.

L'AFM permet de visualiser simplement le relief des macromolécules à analyser et d'observer directement leur structure. Cette méthode permet ainsi d'imager la structure en hélice ou les ramifications de certaines chaînes comme les pectines [60] ou l'acétane [61] (Structures sur la [Figure 10](#)). Comme on l'a vu, il est aussi possible de faire de la spectroscopie de force.

Un problème récurrent est de réussir à attacher fermement la chaîne. Dans la technique d'AFM, les molécules sont en général physiosorbées sur le substrat sur lequel elles vont être étirées. Il arrive que la pointe déplace physiquement la molécule à analyser, pouvant même la sortir du champ de vision [36]. De ce fait, un très grand nombre de scans est nécessaire pour pouvoir détecter l'étirement d'une molécule. Certains, comme Yuri Lyubchenko *et al.* [51], effectuent une modification chimique de la surface de mica pour que les molécules (l'ADN en l'occurrence) puissent s'y lier fortement. L'inconvénient de cette méthode est que la liaison se fait sur un site aléatoire de la molécule. Il n'est donc pas possible de choisir de fixer l'une ou l'autre des extrémités de la molécule. L'idéal serait de concevoir des sortes de poignées permettant de maintenir chacune des extrémités des molécules à analyser à la surface et à la pointe du microlevier. Dans le cas des nucléotides et des protéines, l'abondance des groupes fonctionnels de différente nature rend cette tâche possible, mais ceci reste très difficile à concevoir dans le cas des polysaccharides, à cause du trop grand nombre de groupements hydroxyle [38]. Réussir à attacher les deux extrémités d'une molécule de polysaccharides à des pointes ou à des particules colloïdales servant de poignée n'est à ce jour pas encore réalisé.

Abdenor Fellah *et al.* [37, 38] ont comparé des expériences d'AFM et de pinces optiques, dans différentes situations (différents solvants, différents pH et forces ioniques) où des molécules de pectine



sont physiosorbées entre le microlevier et la surface du capteur piézo-électrique ou sont attachées chimiquement à la surface. Leurs premiers travaux [38] ont montré la possibilité d'attacher des chaînes de pectines à un support à travers la formation de liaisons C—N à l'extrémité réductrice de la pectine. Malheureusement des études ultérieures [37] ont finalement montré que la fixation d'un polysaccharide à la surface du capteur piézo-électrique réduit le nombre d'événements correspondant à l'étirement d'une molécule, et donc le nombre de captures par la pointe du microlevier. La diffusion des molécules physiosorbées sur la surface permettrait donc d'améliorer cette fréquence d'événements, augmentant la probabilité pour qu'une molécule soit captée par la pointe du microlevier. Néanmoins attacher des polysaccharides à la surface par une liaison covalente permet d'appliquer des forces plus importantes avant que le polysaccharide ne se détache.

### I.3.1. Imagerie de polysaccharides à l'échelle de la molécule unique

Des exemples d'images de polysaccharides obtenues par AFM sont présentés sur la Figure 12. De bonnes images nécessitent un bon contrôle des forces. La force appliquée ne doit pas être trop faible sinon le contraste est mauvais, mais elle ne doit pas non plus être trop élevée pour ne pas endommager les molécules. Les temps d'acquisition varient de quelques secondes à plusieurs minutes selon les paramètres choisis, tels que la vitesse de balayage ou la taille de l'échantillon. Cette méthode d'imagerie a été utilisée par exemple pour observer et analyser la nature des ramifications de la pectine [60] (Figure 10, A), observer la structure en hélice de l'acétane [61] (Structure chimique sur la Figure 10, B). Les observations sont plus difficiles que dans le cas des molécules d'ADN λ [51] montré en référence sur la Figure 11.

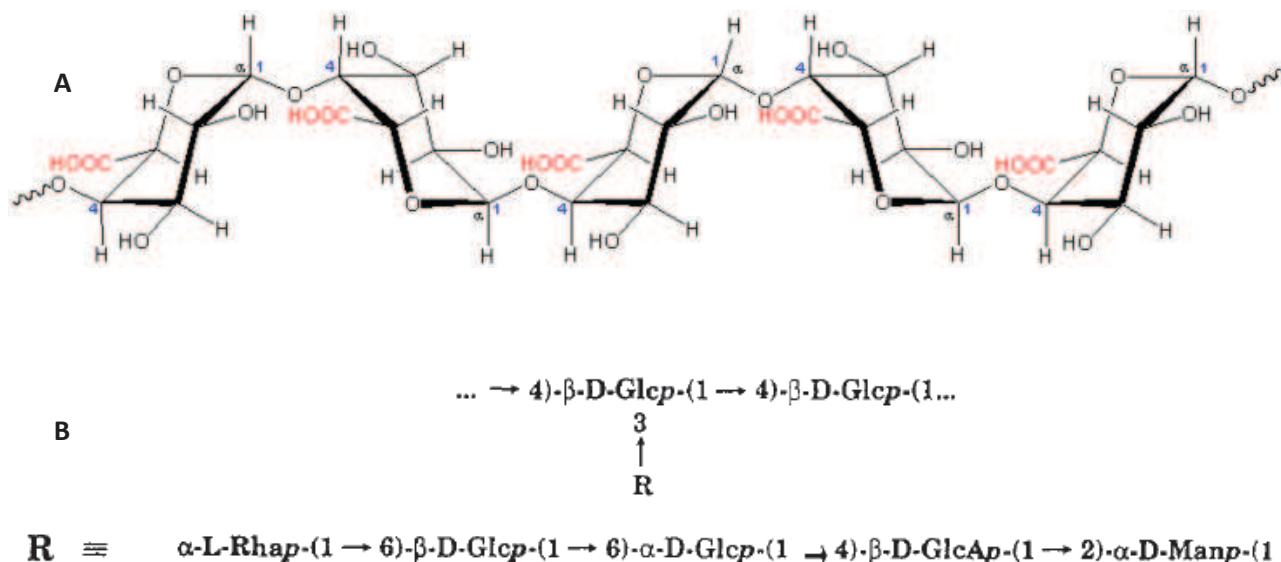


Figure 10 : Structure chimique (A) d'une pectine et (B) de l'acétane

Lyubchenko *et al.* [51] ont par exemple observé des molécules d'ADN dans deux milieux différents, à l'air ambiant et en solution. Ils ont remarqué qu'en solution, le contraste et la résolution sont trois fois meilleurs, ce qui permet d'obtenir de meilleures images. La hauteur apparente des brins d'ADN observés est de 2 à 4 Å à l'air ambiant et de 5 à 7 Å dans l'eau, et ils ont estimé que les molécules ont une longueur de contours de  $15 \pm 1 \mu\text{m}$ . Certaines d'entre elles apparaissent droites et étirées (Figure 11, B) tandis que d'autres, plus majoritaires, sont incurvées (Figure 11, A). D. Pastré *et al.* [62] ont également étudié des brins d'ADN, détectant l'hybridation de deux simples brins d'ADN complémentaires, par AFM.

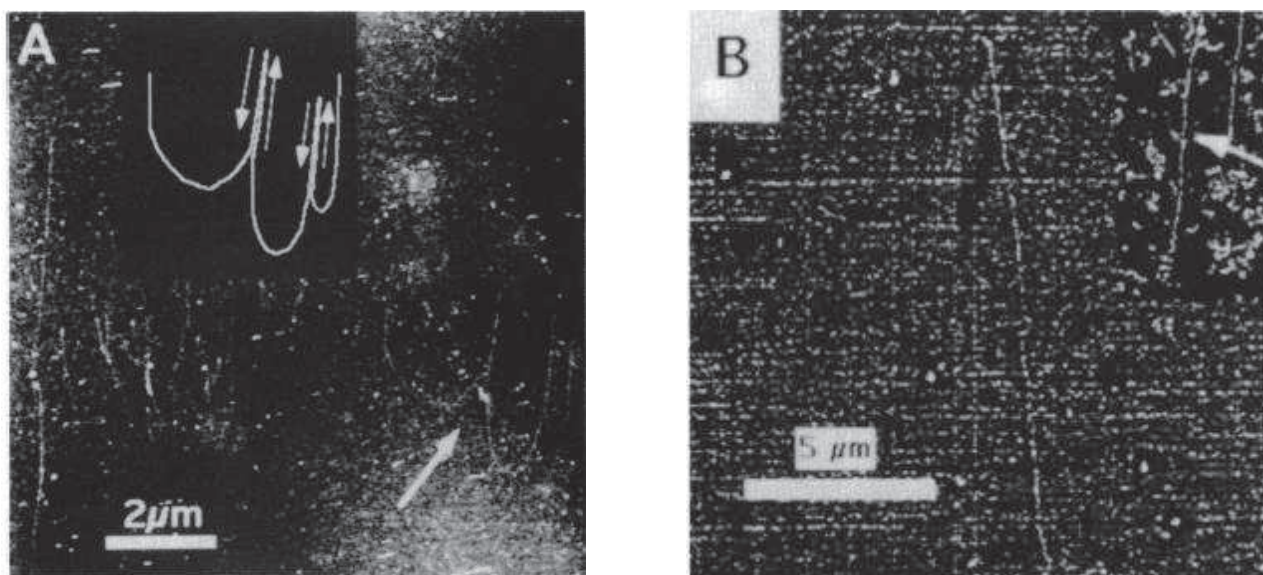
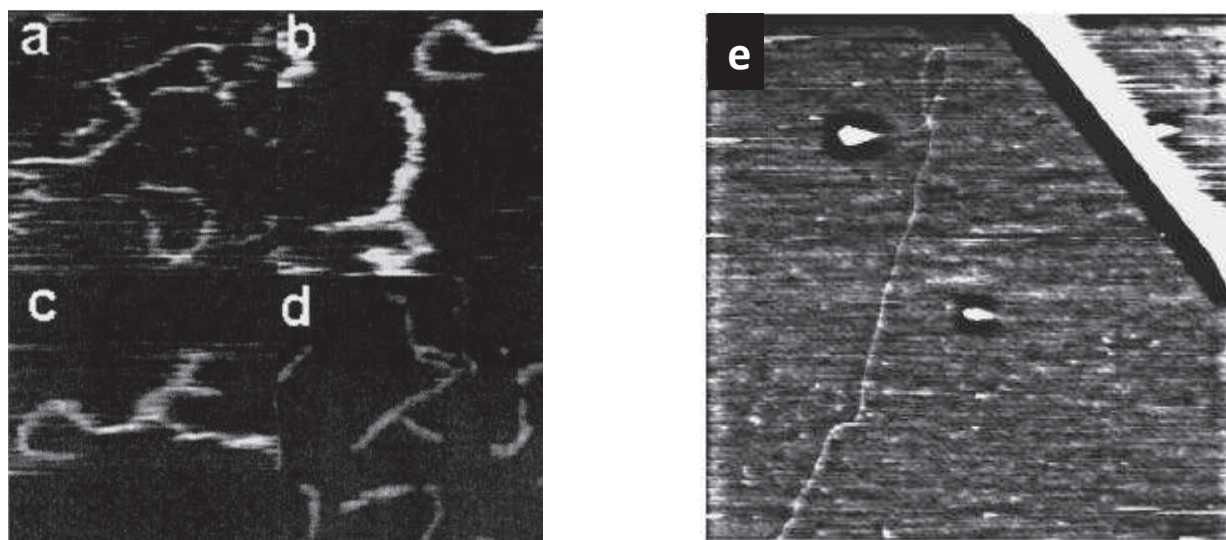


Figure 11 : Images d'un phage  $\lambda$  d'ADN (A) incurvé ou (B) rectiligne [51].

En utilisant la même méthode d'imagerie, par AFM, une étude a été menée par Andrew N. Round *et al.* [60] sur la nature des ramifications d'un polysaccharide. Elle consiste en l'extraction de fractions de pectines provenant de tomates, puis à analyser les images obtenues par AFM. Celles-ci montrent deux populations, l'une correspondant au polymère unique et l'autre correspondant à des agrégats. Ces deux populations sont différenciables grâce aux mesures de hauteurs des macromolécules. Concernant la population contenant les polymères uniques, on observe une hétérogénéité, avec des longueurs de contours comprises entre quelques dizaines et quelques centaines de nanomètres et avec une petite fraction contenant des ramifications. On peut observer des pectines linéaires (Figure 12, a), d'autres possédant une branche (Figure 12, b) ou encore des complexes branchés ou non (Figure 12, c et d).

La possibilité d'obtenir des images de pectines à l'échelle de la molécule unique permet d'observer une hétérogénéité des chaînes présentes en solution, qu'il n'aurait pas été possible d'observer par des méthodes d'analyse classiques. Il est donc possible de caractériser les populations différentes de ces chaînes de pectines ainsi que leur composition sur la base de leur taille et de leur topographie, à l'aide d'un microscope de force atomique.



**Figure 12 :** (a à d) Images de molécules de pectine (a) linéaire, non branchée, (b) avec une ramification, (c) complexe de polymères branché et non branché et (d) possédant plusieurs ramifications[60]. (e) Image d'une chaîne d'acide hyaluronique. [56]

Des études similaires d'imagerie de polysaccharides par AFM ont été menées par Andrew R. Kirby *et al.* [61] pour observer la structure en hélice du polysaccharide acétane et par Mary K. Cowman *et al.* [56] pour celles de l'acide hyaluronique. Les images AFM de l'acétane [61] ont permis de mesurer des épaisseurs des brins de molécules de l'ordre de 10 nm. Cependant cette valeur est peut-être majorée par l'épaisseur de la pointe de l'AFM utilisée. De plus, des fluctuations périodiques ont été observées et attribuées à la structure en hélice du polysaccharide. Les images AFM de l'acide hyaluronique [56] ont révélé la présence d'associations intermoléculaires, en général sous forme de boucles (Figure 12, e). Ils ont également pu estimer la longueur de certaines chaînes d'acide hyaluronique à environ 6,5  $\mu\text{m}$  (comme celle montrée sur la Figure 12, e, en supposant que la chaîne est étirée), ce qui correspondrait à 6500 à 8125 disaccharides, soit une masse moléculaire de  $2,6 \cdot 10^6$  à  $3,3 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ . En moyenne, les chaînes d'acide hyaluronique observées ont une longueur moyenne de 4,1  $\mu\text{m}$ , soit une masse moléculaire moyenne de  $1,6 \cdot 10^6$  à  $2 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Cependant, ces calculs de masse moléculaire basés sur la longueur de la chaîne ne sont proches de la réalité que dans le cas où la chaîne est étirée, ce qui n'est pas le cas en règle générale. Les chaînes d'acide hyaluronique sont plus souvent observées avec des auto-associations qu'en tant que chaînes étirées. Le diamètre des chaînes a également pu être mesuré et est estimé à  $0,6 \pm 0,1 \text{ nm}$ .

### I.3.2. L'AFM, un senseur de conformation des polysaccharides

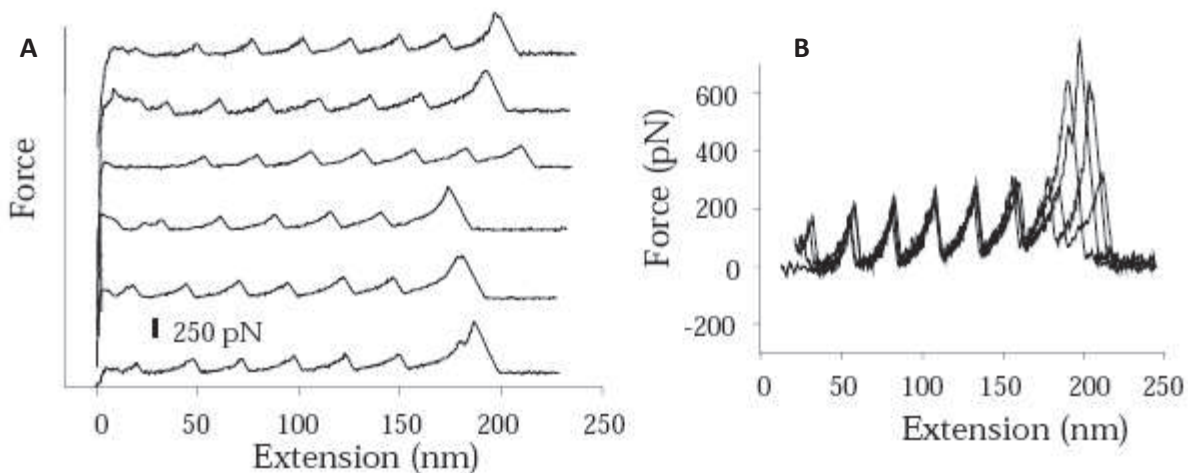
La spectroscopie de force par microscopie de force atomique a d'abord été utilisée en 1994 par Florin *et al.* [63] et Moy *et al.* [64] pour mesurer la force de la liaison entre l'avidine et la biotine et par Lee *et al.* [42] pour mesurer la force de liaison entre deux brins complémentaires d'ADN. Cette méthode a ensuite été appliquée à l'extension d'une unique molécule, un polysaccharide (le dextrane), par Rief *et al.* [39], ainsi que pour des protéines comme la titine [54, 65].

L'AFM permet d'observer les changements de conformations des molécules en fonction de la force appliquée. Cette technique a été utilisée pour observer le dépliement des protéines et les changements de conformation des cycles des polysaccharides. Nous décrivons ci-dessous ces deux exemples.

### I.3.2.a. Dénaturation mécanique des protéines

La pointe du microlevier vient en contact avec le substrat, sur lequel plusieurs protéines ont été adsorbées. Les protéines, fixées à la pointe du microlevier, sont étirées au fur et à mesure que le substrat est éloigné. Les molécules résistant à l'étirement entraînent une déviation du microlevier, jusqu'à ce qu'un réarrangement de la molécule se fasse ou qu'elle cède, se détachant du microlevier ou du substrat. Dans le cas des protéines, les réarrangements correspondent en général à la dénaturation successive des différents domaines de cette protéine [59].

De cette manière, Hermann E. Gaub et son équipe ont étudié la titine, une protéine musculaire constituée d'un enchaînement de plus de 200 domaines d'immunoglobuline [54, 65]. Ils ont enregistré des courbes montrant la force appliquée en fonction de l'élongation de la protéine et ont observé un profil en dents de scie. Les courbes Figure 13, A et B montrent plusieurs de ces courbes.



**Figure 13 :** (A) Courbes d'extension de la titine, constituée de 8 domaines d'Ig. (B) Superposition de ces courbes d'extension de la titine. On observe un motif en dents de scie correspondant à la dénaturation de chacun des domaines Ig l'un après l'autre. La distance entre chaque dent de scie est exactement de 25 nm. [65]

Les courbes obtenues présentent un modèle en dents de scie comprenant jusqu'à sept pics consécutifs correspondant donc chacun au dépliement d'un domaine d'immunoglobuline. Ils ont également observé une périodicité variant entre 25 et 28 nanomètres, supportant l'hypothèse que chaque pic correspond à la dénaturation d'un unique domaine d'immunoglobuline, comprenant 90 acides aminés. La force observée à chaque périodicité n'est pas égale, variant entre 150 et 300 pN, montrant que les différents domaines n'ont pas tous la même stabilité [65]. Le dernier pic, plus intense, correspond au détachement de la molécule.



L'AFM permet donc d'étudier les propriétés mécaniques des protéines, donnant des informations sur la longueur de chaque domaine d'une protéine lors de son dépliement. L'amplitude de la force nécessaire pour induire le dépliement d'un domaine renseigne sur la stabilité mécanique du domaine tandis que l'espacement entre les pics renseigne sur le nombre d'acides aminés présents dans le domaine déplié.

### I.3.2.b. Spectroscopie de force de polysaccharides en molécule unique

M. Rief *et al.* [39] ont été les premiers à utiliser l'AFM en mode spectroscopie de force, sur un polysaccharide. Ils ont étudié plusieurs molécules de dextrane carboxyméthylé, ayant des longueurs allant de 50 nm à 2  $\mu$ m. Cette étude fut la première à démontrer des variations de conformation des molécules, lorsque la force appliquée dépasse un certain seuil (250 pN pour les molécules de dextrane [39]). L'étirement est progressif jusqu'au seuil pour lequel la force appliquée provoque un changement de conformation brutal des cycles saccharidiques [66]. Ce comportement est observé pour tous les polysaccharides possédant une ou des liaisons glycosidiques en position axiale [57, 67, 68]. Marszalek *et al.* [69] ont également observé les changements de conformation de cycles pyranose et ont expliqué ce phénomène à l'aide de modèles mécaniques: le changement conformationnel n'aurait lieu que lorsque la molécule présente au moins une liaison glycosidique axiale, qui agit comme un bras de levier atomique, entraînant une rotation lorsque une force est appliquée. Lorsque les liaisons glycosidiques sont uniquement équatoriales, le moment généré est nul, mais lorsqu'au moins une liaison glycosidique est axiale, un moment apparaît, entraînant une rotation autour de la liaison C-C, et donc un changement de conformation. En l'absence de force appliquée, la conformation la plus stable est la forme chaise  ${}^4C_1$ . Les conformations induites par la force appliquée sont les conformations bateau  ${}^{1,4}B$  et chaise inversée  ${}^1C_4$  (Tableau 2).

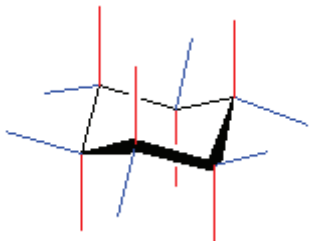
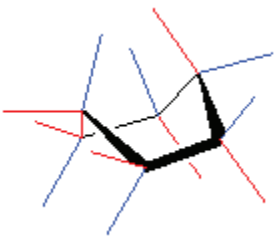
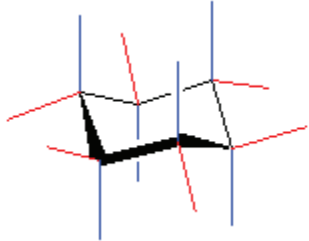
Forme chaise ${}^4C_1$	Forme bateau ${}^{1,4}B$	Forme chaise inversée ${}^1C_4$
		

Tableau 2: Les différentes conformations d'un cycle uronique. [70]

La Figure 14 représente un cycle pyranose dont l'une des liaisons glycosidiques est en position axiale (la liaison  $C_1-O_1$ ). La force appliquée sur l'oxygène  $O_1$  engendre un moment de rotation autour du point de pivot  $P_1$  (situé sur l'axe de rotation imaginaire passant par  $C_2$  et  $O_5$ ), entraînant la transition vers la conformation bateau. A l'opposé, la force appliquée sur l'oxygène  $O_4$  ne possède qu'un

faible bras de levier car sa ligne d'action passe au voisinage du point de pivot  $P_2$  (situé sur l'axe de rotation imaginaire passant par  $C_3$  et  $C_5$ ). Elle ne peut donc pas entraîner de changement de conformation.

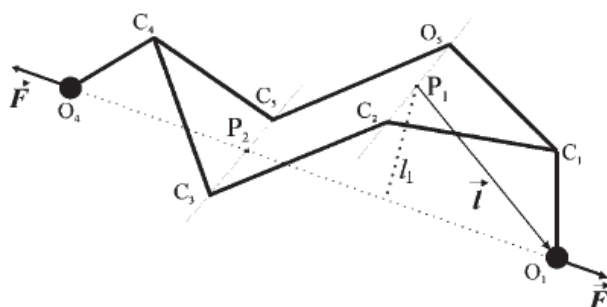


Figure 14 : Modèle mécanique simplifié du cycle pyranose montrant les points d'application des forces ainsi que les points de pivot imaginaires [69].

Les polysaccharides comme la cellulose, ne possédant que des liaisons équatoriales ( $1e-4e$ ), ne subissent aucune modification (Figure 15, C), ne possédant pas ce "levier moléculaire" que sont les liaisons axiales. Les polysaccharides comme l'amylose, possédant les deux types de liaisons, axiale et équatoriale ( $1a-4e$ ), peuvent subir une modification conformationnelle lorsqu'ils sont étirés (Figure 15, A, B et C). Les pectines, possédant quant à elles deux liaisons axiales ( $1a-4a$ ), peuvent subir deux modifications conformationnelles, une pour chaque liaison glycosidique axiale (Figure 15, A).

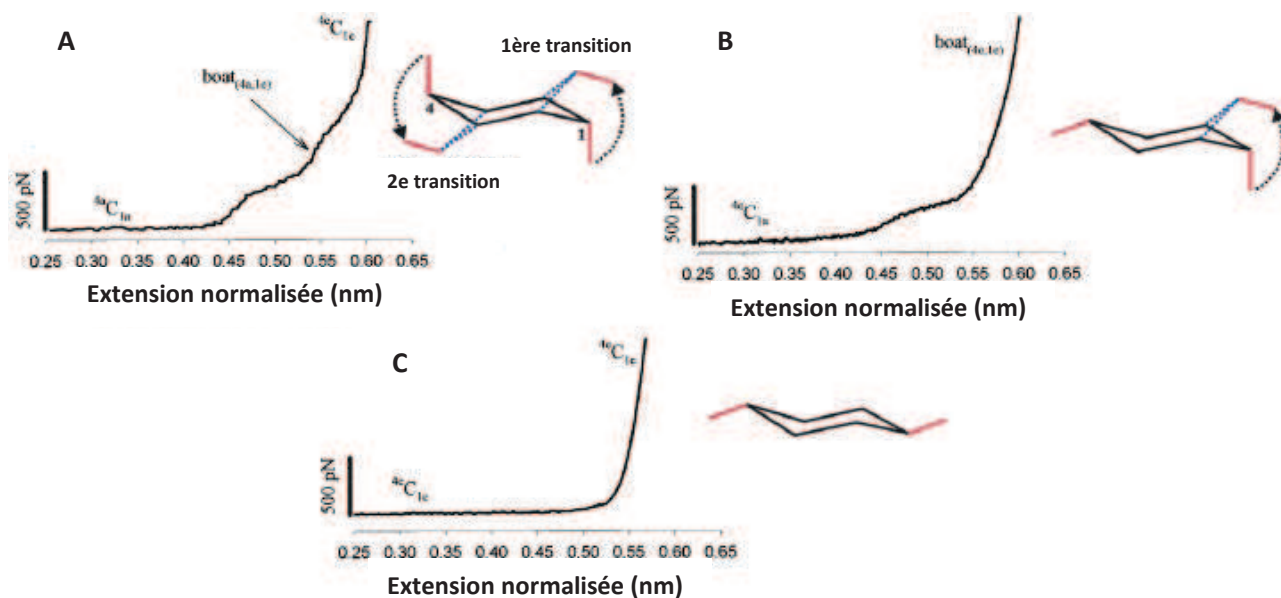
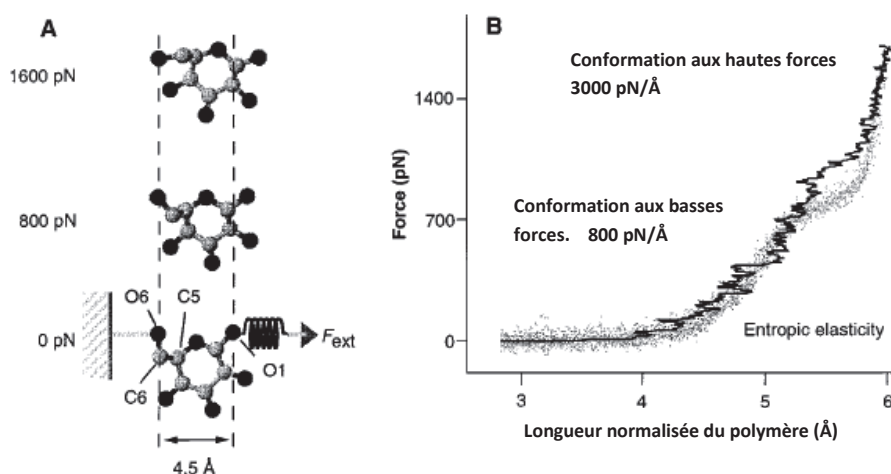


Figure 15 : « Empreintes digitales » de différents polysaccharides possédant 0, 1 ou 2 liaison(s) glycosidique(s) axiale(s), accompagnés de leur structure. [69]

Ces changements conformationnels sont appelés des « clics » [8]. Des analyses par modélisation moléculaire suggèrent que les cycles des chaînes de polysaccharides, préférentiellement en conformation chaise, adoptent la conformation bateau, plus longue. Des études ultérieures de cycles pyranose montrent

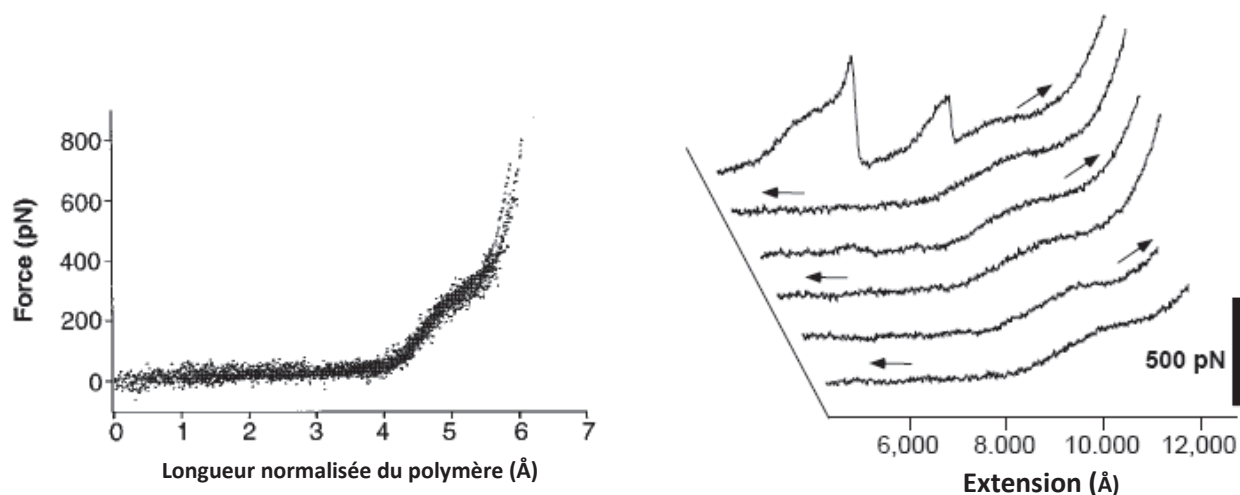
la présence d'une seconde étape, aboutissant à la reformation de la conformation chaise mais en position inversée [69]. La force à laquelle se produit cette transition est constante pour chaque type de polysaccharide et est indépendante de la longueur de la chaîne [71]. Les différentes conformations en chaise  ${}^4C_1$  et  ${}^1C_4$  sont séparées par une barrière énergétique d'environ 11 kcal/mol (18,5  $k_B T$ ), et la conformation intermédiaire en bateau possède une énergie d'environ 5 à 8 kcal/mol (8 à 14  $k_B T$ ) supérieure à celle de la conformation chaise  ${}^4C_1$ . C'est pourquoi les transitions conformationnelles passent préférentiellement d'une forme chaise  ${}^4C_1$  à la forme bateau  ${}^1C_4$  puis à la forme chaise inversée  ${}^4C_1$  et non de la forme chaise  ${}^4C_1$  à la forme chaise inversée  ${}^4C_1$  directement.

Matthias Rief, Filipp Oesterhelt et Hermann E. Gaub [39, 72, 73] ont étudié les propriétés mécaniques de différentes chaînes de polysaccharides. Ils ont étudié les relations force/extension sur des échantillons de carboxyméthyl-dextrane de masse 500 000 g/mol [39], la carboxyméthylation du dextrane permettant de le fixer sur la pointe de l'AFM. Des simulations moléculaires ont montré qu'à faibles forces, l'élasticité de la molécule est majoritairement due à la torsion de la liaison  $C_5-C_6$  (Figure 16, A), résultant en une élongation des filaments. Cette élongation est proportionnelle à la force appliquée jusqu'à environ 1000 pN (Loi de Hook). Au-delà, la liaison se retourne, ce qui se traduit par une discontinuité sur la courbe force/extension. Une augmentation de la rigidité de la chaîne est également observable. La raideur des segments passe de 7500 pN/nm pour des forces inférieures à 1000 pN à 30000 pN/nm pour des forces supérieures (Figure 16, B).



**Figure 16 :** (A) Déformation du cycle pyranose du dextrane à différentes forces d'extension. (B) En noir, courbe force-extension de 5 unités glucose du dextrane, obtenues par simulations moléculaires et en gris, superposition de 10 courbes force-extension normalisées, mesurées sur le dextrane natif. [39]

Pour ces expériences, la pointe de l'AFM a été rendue hydrophobe par silanisation (auto-assemblage de molécules d'alkoxysilane, formant des liaisons covalentes -Si-O-Si-) pour permettre une meilleure adsorption des chaînes de polysaccharides. Pour éviter que plusieurs chaînes ne soient adsorbées en même temps, la pointe est approchée et retirée lentement, jusqu'à ce que la courbe enregistrée ne montre qu'une unique chaîne s'y soit liée. Les courbes d'extension normalisée de filaments de dextrane de différentes longueurs et avec différents microleviers, ont été représentées sur la Figure 17, A ce qui montre la reproductibilité de la technique. Notons que l'extension des molécules est totalement réversible, les courbes successives ne présentent aucune hystérésis (Figure 17, B).



**Figure 17 :** (A) Superposition de plusieurs courbes force/extension de dextrane carboxyméthylé. Les courbes sont normalisées d'après la longueur du polymère. (B) Courbes d'extension successives de la même molécule de dextrane, ne montrant aucune hystérésis. [39]

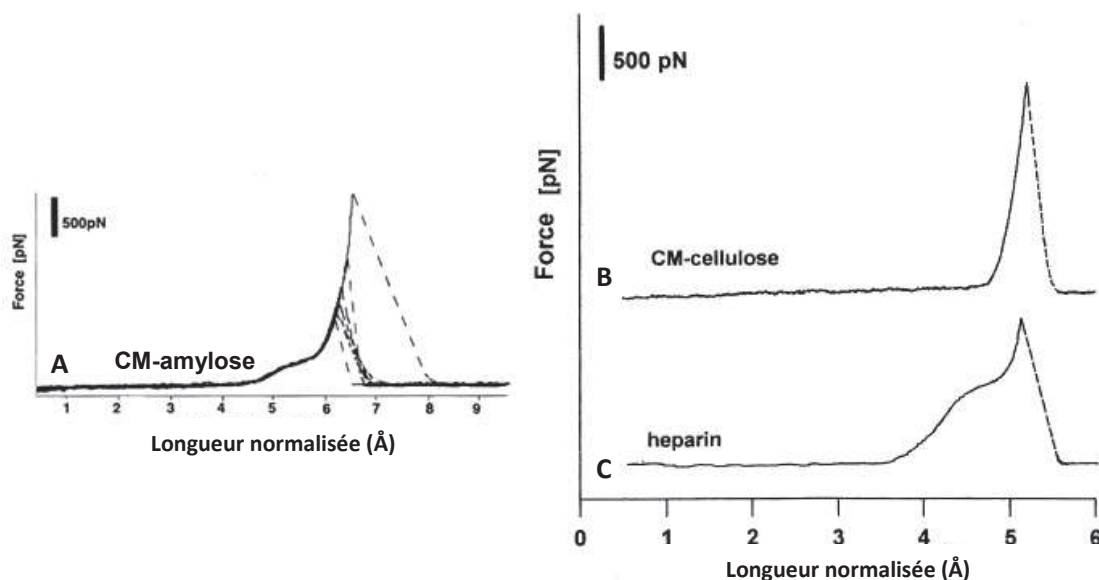
Piotr E. Marszalek et Julio M. Fernandez ont étudié les courbes d'extension de l'amylose, du dextrane et de molécules de pectines[74] tandis que le groupe d'Hermann E. Gaub a comparé les courbes d'extension de polysaccharides reliés par des liaisons  $\alpha$ -(1,4) (l'amylose et l'héparine) avec celles de polysaccharides reliés par des liaisons  $\beta$ -(1,4) (la cellulose, un isomère structural de l'amylose) [72]. Comme dans les précédentes expériences sur le dextrane, l'amylose et la cellulose ont été carboxyméthylées pour faciliter l'adsorption sur la pointe du microlevier. Sur la Figure 18 sont représentées les courbes d'extension de ces polysaccharides. Pour l'amylose (Figure 18, Courbe A), l'extension de la molécule augmente linéairement avec la force appliquée jusqu'à atteindre un plateau à environ 300 pN (pour une longueur normalisée d'environ 5 Å), lequel est suivi d'une forte augmentation de l'extension de la molécule avec la force appliquée. La rigidité de la chaîne augmente également, la raideur des segments passant de 11 000 pN/nm à 28 000 pN/nm. Par comparaison, la cellulose, isomère de l'amylose pour lequel la liaison glycosidique est une liaison  $\beta$ -(1,4), ne montre pas la présence de ce plateau (Figure 18, Courbe B). La courbe ne montre qu'une forte augmentation de la force lorsque l'extension de la molécule approche de la longueur de contour de la molécule.

Les chaînes de cellulose apparaissent également plus rigides que celles d'amylose, avec une raideur des segments d'environ 50 000 pN/nm. La valeur de la longueur de persistance confirme ce résultat. Elle passe de 0,54 nm pour l'amylose à environ 4 nm pour la cellulose. Les deux isomères ont la même composition chimique mais diffèrent uniquement par la liaison glycosidique (respectivement  $\alpha$ -(1,4) et  $\beta$ -(1,4)). La liaison glycosidique  $\beta$  de la cellulose entraîne une rotation de 180° de chaque résidu glucose ce qui permet à la cellulose d'adopter une conformation étendue, rigide. Par opposition, la liaison glycosidique  $\alpha$  de l'amylose permet la simple rotation de la chaîne, ce qui lui confère une conformation très flexible, en hélice. Cette transition conformationnelle correspond à une « empreinte digitale » des glycanes reliés par des liaisons  $\alpha$ -(1,4).

Les courbes force/extension de l'amylose et de la cellulose sont comparées à celle de l'héparine, un glycosaminoglycane possédant une liaison glycosidique  $\alpha$ -(1,4) et dont les substituants sont sulfatés [72, 75]. A l'équilibre, la galactosamine et l'acide glucuronique de l'héparine sont en conformation chaise  ${}^4C_1$  tandis que l'acide iduronique est en conformation chaise inversée  ${}^1C_4$ . L'héparine, à travers ses résidus glucosamine et acide iduronique possédant des liaisons axiales, présente des transitions



conformationnelles lorsque la molécule est soumise à une force. L'héparine montre également la présence d'un plateau, caractéristique d'une liaison glycosidique 1→4 (Figure 18, Courbe C), cependant, ce plateau intervient à des forces deux fois plus élevées que pour l'amylose (à 700 pN au lieu de 300 pN pour l'amylose) [72]. La longueur du plateau ainsi que la pente de la courbe après le plateau pour l'amylose ou pour l'héparine sont semblables, ce qui indique fortement que ce plateau est dû à la même transition conformationnelle. La différence de hauteur du plateau est attribuée à la présence de différents substituants entre les deux polysaccharides.



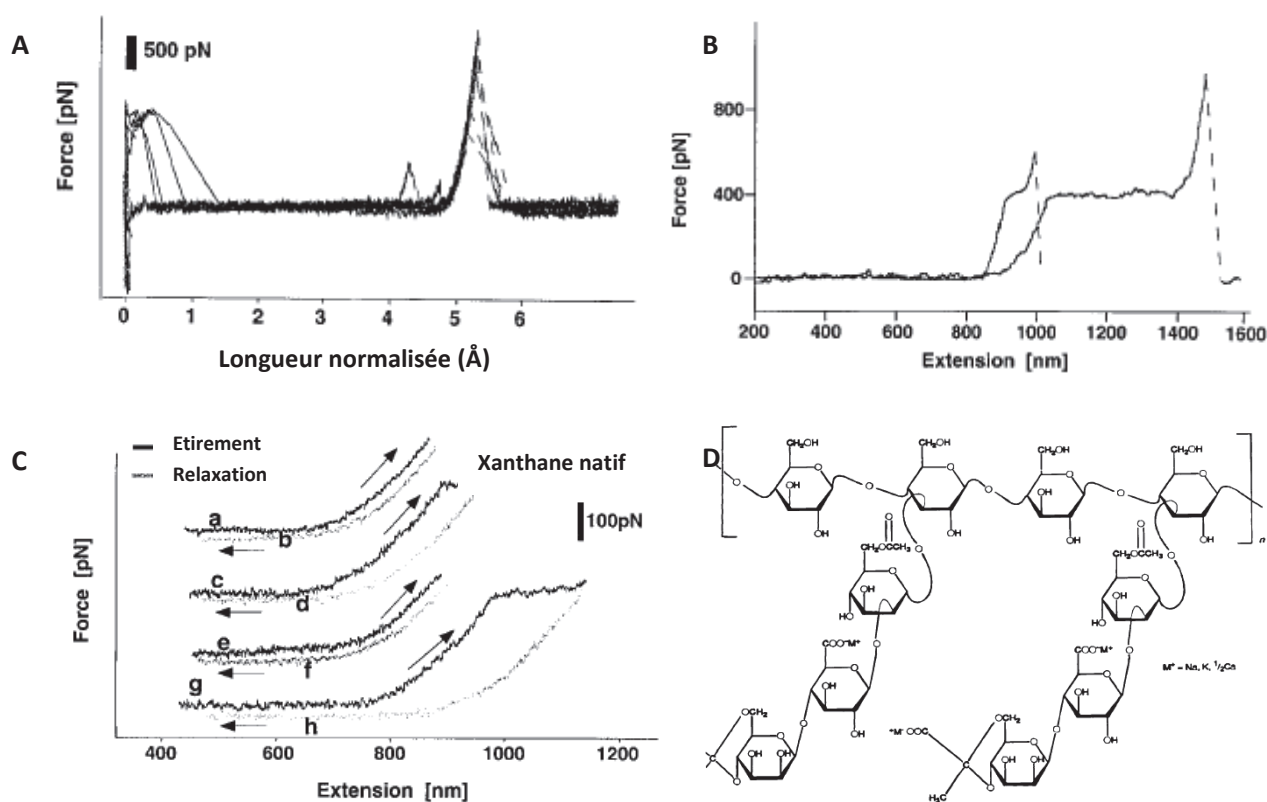
**Figure 18 :** (A) Superposition de différentes courbes d'extension normalisées d'amylose carboxyméthylée. (B et C) Courbes d'extension normalisées de (B) la cellulose carboxyméthylée et (C) de l'héparine. [72]

D'après les simulations effectuées par Marszalek *et al.* [75], l'acide iduronique de l'héparine passe de la forme chaise inversée  ${}^1C_4$  à la forme chaise  ${}^4C_1$  sous l'action d'une force suffisamment grande. La longueur de la molécule est augmentée d'environ 16 %, la longueur de la liaison  $O_1-O_4$  croît de 4,682 Å à 5,428 Å.

C'est le cas aussi lorsque la force est appliquée sur la glucosamine, la longueur de la liaison  $O_1-O_4$  passe alors de 4,659 Å à 5,566 Å. Une force appliquée sur l'acide glucuronique n'entraîne par contre aucun changement de conformation et la liaison  $O_1-O_4$  n'augmente que de manière négligeable.

Ces résultats permettent de prédire l'effet d'une force sur une chaîne d'héparine. La longueur d'une chaîne d'héparine, constituée à 80 % du dimère appelé « A » (constitué d'un acide iduronique et d'une glucosamine) et de 20 % du dimère « B » (constitué d'un acide glucuronique et d'une galactosamine), est augmentée de 15,8 % après application d'une force suffisamment grande. Ces conformations transitionnelles ont une conséquence biologique. Elles permettraient de réguler l'affinité de différents ligands envers l'héparine. Dans leur état de relaxation (l'acide iduronique et la glucosamine étant sous les formes chaise inversée  ${}^1C_4$  et chaise  ${}^4C_1$  respectivement), une haute affinité du ligand pour l'héparine est assurée. Lors de l'exocytose, les forces exercées entraîneraient la rotation de l'acide iduronique dans sa conformation chaise  ${}^4C_1$  et de la glucosamine dans sa conformation bateau. Dans cet état étendu, la constante d'affinité du ligand pour l'héparine décroît fortement, ce qui lui permettrait de diffuser en dehors de la matrice.

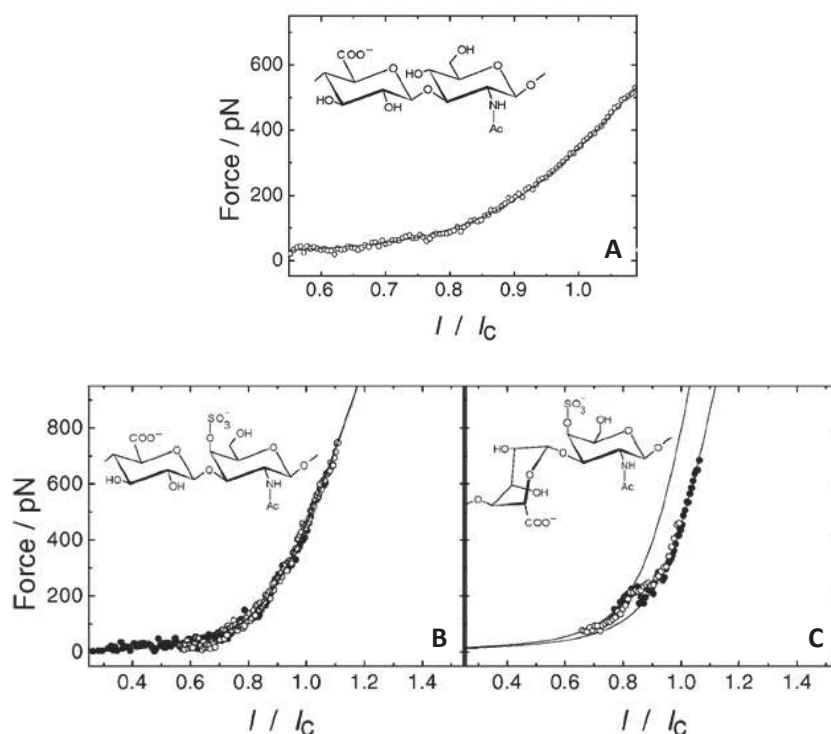
Par ailleurs, à partir des courbes force/extension, on distingue des différences entre les conformations native et dénaturée du xanthane, ainsi que des différences sur les courbes d'extension de ces deux composés [73]. Le xanthane est un hétéropolysaccharide dont la structure primaire consiste en la répétition d'unités pentasaccharidiques, formées par deux unités glucose, deux unités mannose et une unité acide glucuronique, au ratio molaire 2,8 : 2 : 2 [76]. Il possède dans sa conformation native une structure secondaire en hélice, sa courbe d'extension est différente de celle du xanthane dénaturé. Pour le xanthane natif, l'élasticité augmente proportionnellement à la force appliquée, et un plateau apparaît sur la courbe. Ce plateau n'est pas présent sur les courbes d'extension du xanthane dénaturé. Ce plateau est attribué à la rupture de l'hélice. Contrairement au cas du dextrane, la transition du xanthane natif sous l'action d'une force appliquée est irréversible (Figure 19, C). Ce comportement est attribué à la destruction de l'hélice.



**Figure 19 : (A) Superposition de différentes courbes d'extension normalisées du xanthane dénaturé. (B) Courbe d'extension du xanthane natif montrant un plateau lorsque la force appliquée devient supérieure à 400 pN. (C) Courbes d'extension successives d'une même molécule de xanthane natif. La déformation des courbes montre la destruction de l'hélice du xanthane. (D) Structure chimique du xanthane. [73]**

Les études de spectroscopie de force par AFM ne se limitent pas aux polysaccharides mentionnés. D'autres polysaccharides, dont certains font partie de la famille des glycosaminoglycanes, ont été étudiés par l'équipe de Richard G. Haverkamp et Martin A.K. Williams [8, 37, 71, 77]. Ces auteurs ont caractérisé et comparé l'élasticité de différents glycosaminoglycanes, tels que l'acide hyaluronique, le dermatane sulfate et la chondroïtine sulfate [77]. D'après les prévisions théoriques basées sur la position axiale ou équatoriale des liaisons glycosidiques, l'acide hyaluronique et la chondroïtine sulfate seraient moins élastiques que le dermatane sulfate puisque leurs liaisons glycosidiques sont en position équatoriale alors qu'elles sont en position axiale pour le dermatane sulfate. Les courbes d'extension de l'acide hyaluronique et de la

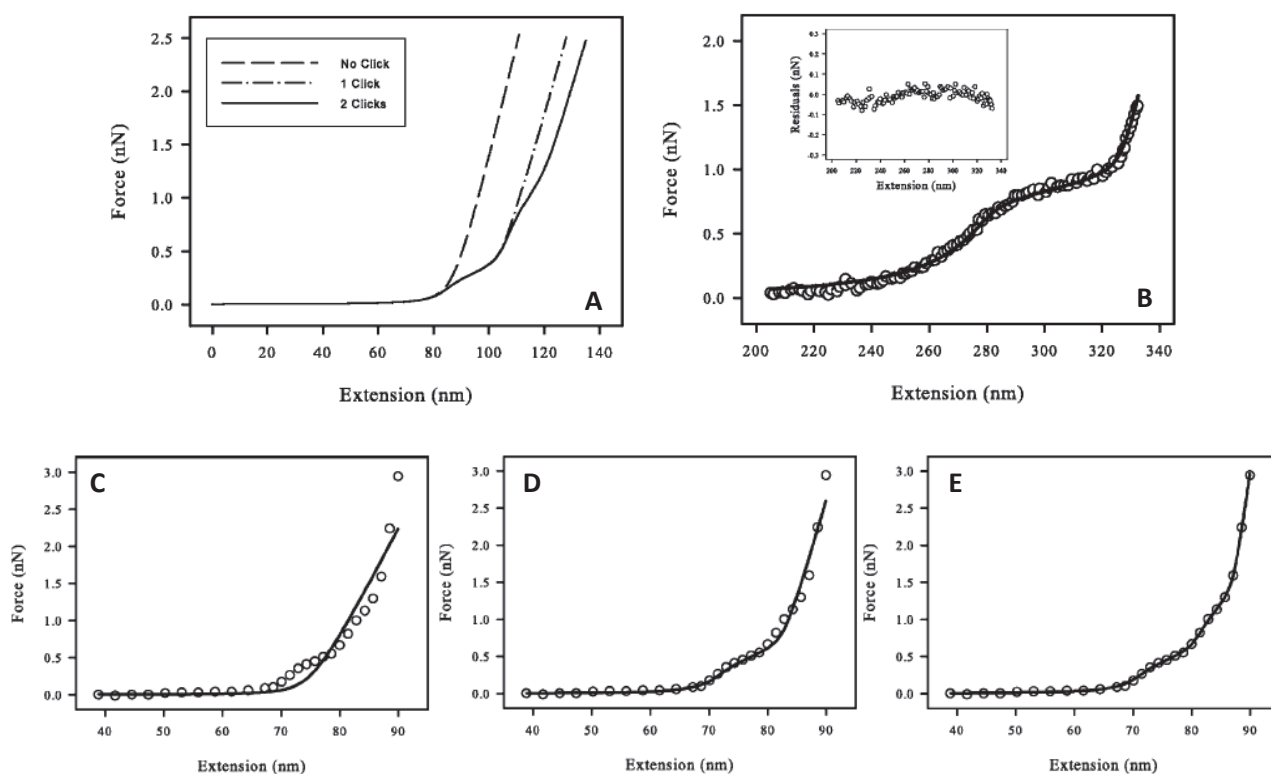
chondroïtine sulfate ne montre effectivement pas de plateau contrairement à celle du dermatane sulfate (Figure 20).



**Figure 20 :** Courbes d'extension de (A) l'acide hyaluronique, (B) la chondroïtine sulfate et (C) le dermatane sulfate. En insert sont représentées les structures chimiques de ces trois polysaccharides. [77]

Un modèle de chaîne semi-flexible (Worm Like Chain, WLC) représente avec succès la région de la courbe aux faibles forces, pour lequel l'étirement est dominé par l'élasticité d'origine entropique. Le comportement aux grandes forces s'explique bien par les modèles conformationnels de clics discutés précédemment.

La Figure 21, A représente les courbes force-extension obtenues par simulation en prenant en compte zéro, un ou deux clics. Ces trois modèles sont comparés à la courbe force-extension expérimentale de la pectine sur les Figure 21, C, D et E. Le modèle prenant en compte deux clics se superpose parfaitement à la courbe force-extension de la pectine, contrairement aux deux autres modèles. La Figure 21, B représente la courbe force-extension expérimentale (les cercles) du dextrane à laquelle est superposée la courbe obtenue par simulation utilisant le modèle à un clic (la courbe en trait plein) [58, 66, 68, 69, 74, 75].



**Figure 21** : Courbes force-extension (A) d'un polysaccharide possédant zéro, un ou deux clics, obtenues par simulation, (B) du dextrane dans l'eau et (C, D et E) de la pectine approximée par les trois différents modèles (zéro, un ou deux clics). Les cercles sont les points expérimentaux et le trait plein correspond à l'approximation obtenue par simulation. [71]

### I.3.2.c. Etude et discrimination d'isomères par AFM

Des expériences d'AFM ont été aussi réalisées pour caractériser des mélanges de molécules isomères ou d'autres molécules de polysaccharides plus complexes. Martin A.K. Williams *et al.* ont ainsi utilisé la spectroscopie de force par AFM pour caractériser différents polysaccharides co-polymériques, dans lesquels les liaisons glycosidiques  $\alpha$  et  $\beta$  alternent aléatoirement. C'est le cas en particulier des chaînes d'alginate, un polysaccharide formé par la répétition d'acide mannuronique et d'acide glucuronique, à différents ratios [8].

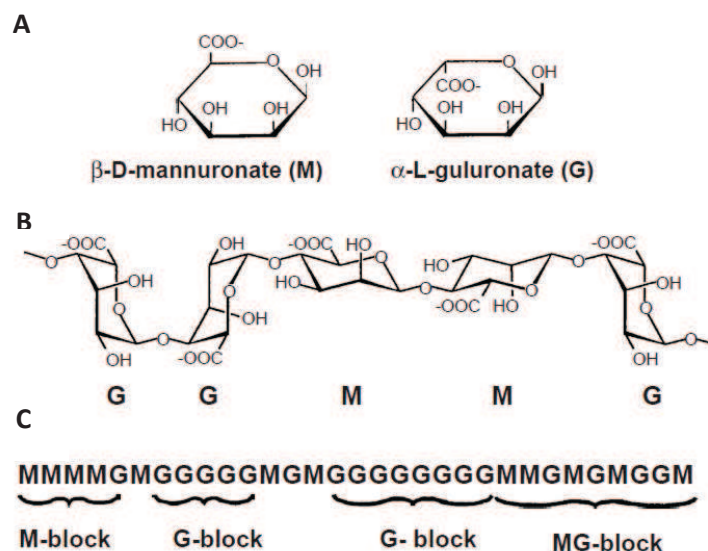


Figure 22 : (A) Structures fines des acides mannuronique et glucuronique. (B) et (C) Possibles séquences moléculaires reliant plusieurs molécules d'acides mannuronique et glucuronique. [8]

L'acide mannuronique ayant ses deux liaisons en position équatoriale et l'acide glucuronique ayant ses deux liaisons en position axiale, des molécules d'alginate possédant différents ratios acide mannuronique/acide glucuronique présentent des courbes force/extension différentes.

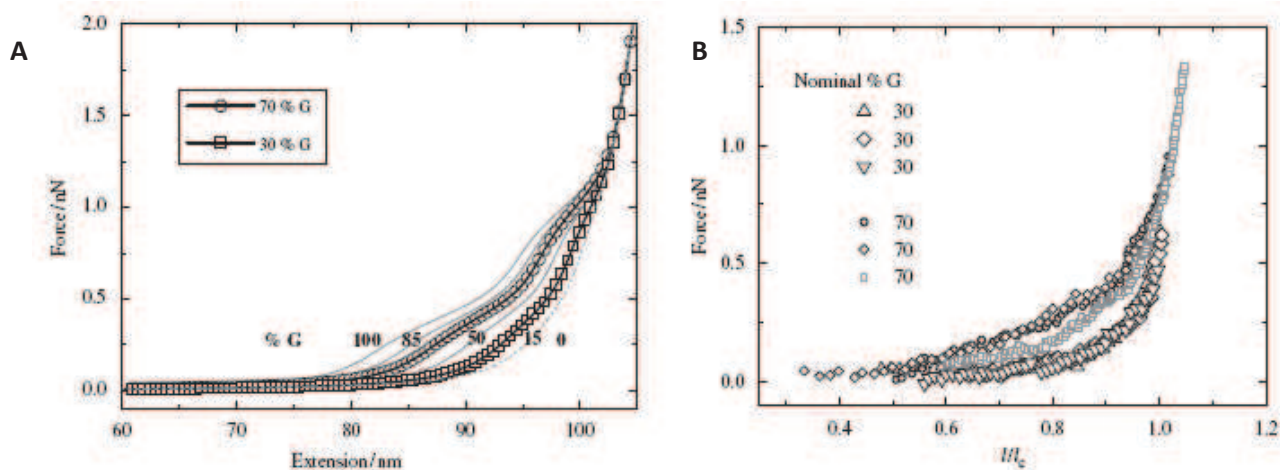


Figure 23 : Courbes force-extension de différents alginates, possédant différents ratios en acide glucuronique obtenues par (A) simulation ou par (B) expérience. [8]

La Figure 23, A correspond aux courbes obtenues par simulation pour différents ratios Acide mannuronique (M) / Acide glucuronique (G). Des différences de l'ordre de 10% du ratio M/G permettent théoriquement de discerner des molécules différentes. En pratique, les courbes expérimentales obtenues (Figure 23, B) montrent qu'il est possible de différencier des molécules possédant 70% de G de celles n'en possédant que 30%.

Qingmin Zhang et Piotr E. Marszalek [78] ont utilisé la capacité de l'AFM à forcer des changements conformationnels pour distinguer deux polysaccharides, le  $\beta$ -galactane et l'amylose (Figure 24, B). Ces deux isomères possèdent chacun une liaison axiale et une liaison équatoriale mais dans l'amylose, la liaison glycosidique ( $C'_1-O_1$ ) est axiale et la liaison aglycone ( $O_1-C_4$ ) est équatoriale, tandis que pour le  $\beta$ -galactane l'orientation de ces liaisons est inverse.

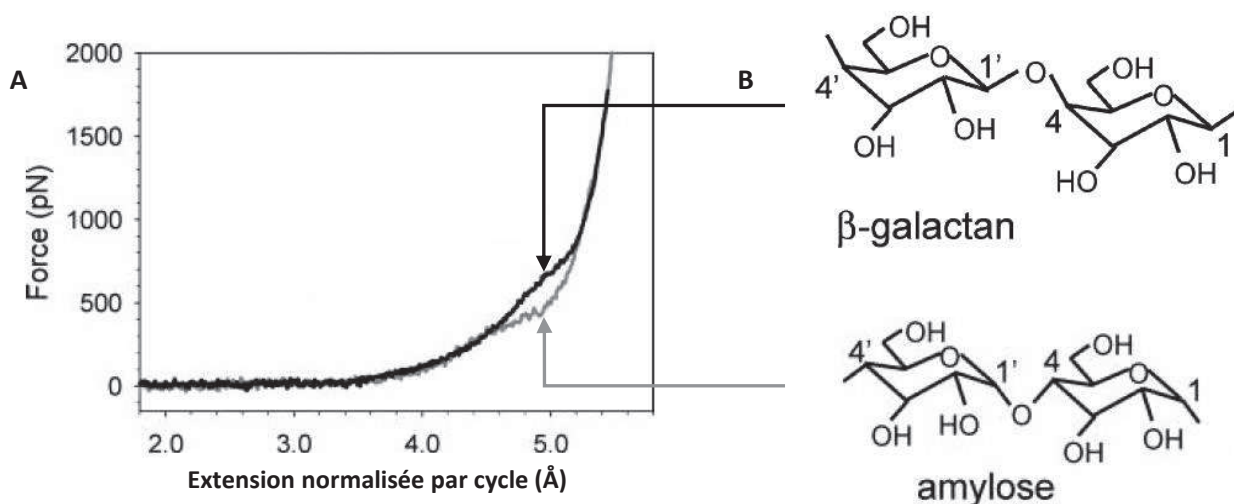
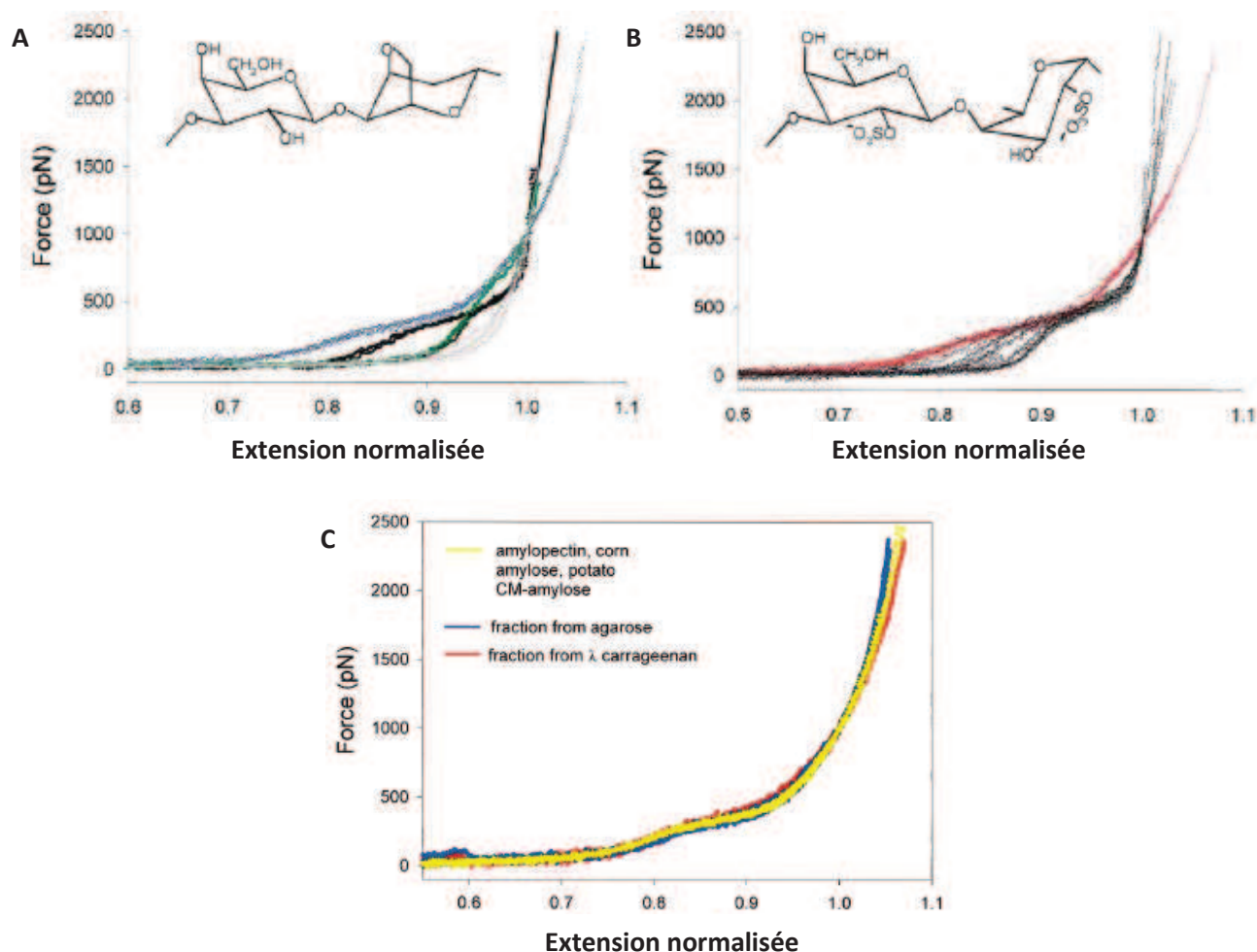


Figure 24 : (A) Comparaison entre les courbes d'extension du  $\beta$ -galactane (en noir) et de l'amylose (en gris). (B) Structures chimiques de l'amylose et du galactane. [78]

Les courbes de ces deux molécules se superposent parfaitement à faibles (< 4,4 Å / cycle) et à fortes (> 5,2 Å / cycle) extensions normalisées mais diffèrent à des valeurs d'extensions normalisées intermédiaires. De plus, les deux courbes montrent chacune un unique plateau obtenu pour différentes forces, 640 pN pour le  $\beta$ -galactane et 280 pN pour l'amylose.

Les auteurs ont également identifié par AFM la présence d'un contaminant amylose dans des échantillons d'agarose et de carraghénane [58].



**Figure 25 :** Courbes de force obtenues pour (A) l'agarose et (B) le carraghénane. Chacune de ces molécules montre plusieurs courbes, correspondant à plusieurs fractions différentes. (C) Superposition des courbes bleue de (A) et rouge de (B) avec celle de l'amylose. [58]

Ces études montrent qu'il est possible d'utiliser la technique d'AFM pour distinguer différentes molécules au sein d'un mélange. Il est même possible d'étudier des copolymères de séquence différente à la condition que le nombre de liaisons axiale et équatoriale entre monomères soit différent. Cependant, il n'est pour l'instant pas possible de déterminer totalement le nombre et la position des monomères au sein de la chaîne.



## I.4. Les nanopores

### I.4.1. Historique

En 1977, deux groupes de recherche ont découvert la première méthode de séquençage de l'ADN [79, 80] utilisant l'électrophorèse sur gel pour séparer des fragments d'ADN avec une résolution d'une unique base. Les difficultés d'utilisation (produire une seule bande détectable sur un gel d'électrophorèse nécessite approximativement  $10^{10}$  fragments d'acides nucléiques [81]), le temps de travail nécessaire (Venter *et al.* [82] ont mis 9 mois pour séquencer une portion du génome humain, de 2,91 milliard de paires de bases) et surtout le coût énorme de ce séquençage (environ 10\$ par base soit plusieurs milliards de dollars pour tout le génome humain) ont poussé la communauté scientifique à chercher de nouvelles méthodes plus simples et moins onéreuses. Le projet « Human Genome Project », démarré en 1990, a déjà permis une importante réduction du coût du séquençage, passant à 1\$ pour 10 bases, soit un coût 100 fois moins important [83]. Les techniques actuelles de séquençage, dites de 2<sup>nd</sup>e génération, permettent de séquencer l'intégralité d'un génome humain pour un prix compris entre 100 000\$ et 1 000 000\$ [84]. Elles reposent sur l'utilisation d'enzymes néanmoins coûteuses, de molécules fluorescentes et d'équipements sophistiqués d'imagerie [85]. Les informations génétiques obtenues pourraient avoir de nombreuses applications médicales comme la personnalisation des traitements pour chaque patient, la prévention des maladies ou encore la recherche sur le cancer, mais également dans le domaine de l'agriculture et bien d'autres encore.

Au début des années 1990, David Deamer, Daniel Branton et John Kasianowicz ont cherché à mettre au point une nouvelle méthode de séquençage ultra-rapide basée sur le transport d'ADN simple brin à travers des canaux de très petites tailles, appelés nanopores. Cette technique de séquençage par nanopore repose sur une technique simple de détection électrique du passage de chacune des bases de l'ADN à travers un nanopore.

Cette technique de détection électrique est basée sur le principe du compteur de Coulter [44], développé en 1953 qui permet de compter les particules présentes dans un fluide. Un courant est établi entre deux compartiments séparés par un conduit de faibles dimensions (de l'ordre d'une centaine de microns pour le compteur de Coulter). Chaque fois qu'une particule traverse le conduit, la résistance électrique augmente et le courant électrique chute. En étudiant les variations de courant, on remonte aux paramètres de forme de la particule ayant traversé le conduit (en particulier le volume qu'occupe cette particule) tandis que le nombre de blocages de courant renseigne sur la concentration des particules en solution. DeBlois et Wesley ont repris ce principe dans les années 1970 [86] pour étudier des suspensions de virus.

Suite aux travaux de l'équipe de Kasianowicz [50], des nanopores protéiques (en particulier l' $\alpha$ -hémolysine du staphylocoque doré) possédant des canaux internes nanométriques commencèrent à être utilisés en tant qu'outils d'analyse de molécules d'ADN ou d'ARN. L'utilisation des nanopores fut ensuite étendue à l'étude du dépliement/repliement de protéines et à l'analyse d'autres types de molécules naturelles et synthétiques.



## I.4.2. Différents types de nanopores utilisés pour des expériences de molécules uniques

Il existe de nombreuses variétés de nanopores, différents par leur taille, leur charge ou leur composition. Ils sont d'abord classés selon leur origine biologique ou artificielle.

### I.4.2.a. Nanopores protéiques

Les systèmes vivants présentent de nombreux types de canaux et de pores, de nature lipidique ou protéique. Les nanopores biologiques utilisés dans les expériences sont en général des canaux protéiques insérés dans des membranes de lipides. Les canaux protéiques possédant la taille suffisante pour laisser passer des macromolécules sont des toxines (de poids moléculaire généralement supérieure à  $20 \cdot 10^3$  g/mol) souvent sécrétées par des bactéries [87, 88]. Ces toxines peuvent être utilisées comme poisons pour tuer les cellules envahies par les bactéries. Elles rendent les cellules intoxiquées perméables à certains ions ou parfois à des protéines.

Toutes ces toxines sont classées en deux familles : l'une, correspondant aux protéines formant des canaux via des hélices  $\alpha$ , appelée  $\alpha$ -PFT (**P**ore **F**orming **T**oxin), et l'autre aux protéines formant des canaux par des feuillets  $\beta$ , appelée  $\beta$ -PFT [89].

#### Les $\alpha$ -PFT

Le mécanisme d'insertion des toxines de la classe des  $\alpha$ -PFT demeure très peu compris. Le nombre de monomères impliqués dans l'oligomérisation, lors de la formation du pore, reste inconnu pour la majorité de ces toxines. Cependant, le passage de la forme de monomère soluble à la formation du canal se fait en trois étapes :

- ~ La liaison de la toxine à un récepteur à la surface de la membrane cellulaire
- ~ Le dépliement de la toxine, permettant de libérer les hélices hydrophobes
- ~ L'insertion du canal ionique

Par exemple (Figure 26), les colicines de la bactérie *Escherichia coli*, en créant des pores, dépolarisent la membrane et entraînent la mort de la cellule [89]. Le domaine de la toxine responsable de la formation du pore est composé de dix hélices  $\alpha$ , dont deux hélices hydrophobes, reposant au centre du domaine, forment une boucle (hairpin) qui va s'insérer dans la membrane dès le début de la formation du pore. Autre exemple d' $\alpha$ -PFT, la toxine diphtérique qui est composée de deux sous-unités reliées par un pont disulfure. La première sous-unité permet l'insertion du canal indispensable au passage de la seconde unité. Une fois insérée dans le cytosol, celle-ci inhibe la synthèse protéique et tue la cellule [89].

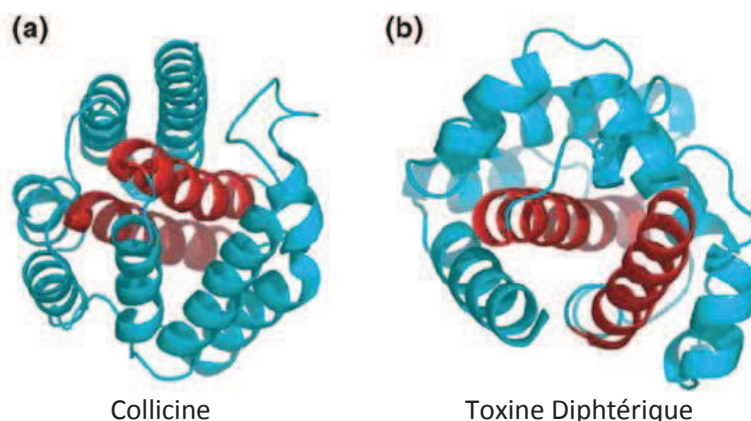


Figure 26 : Structure de 2  $\alpha$ -PFT, (a) la colicine et (b) la toxine diphtérique. [89]

### Les $\beta$ -PFT

Contrairement aux  $\alpha$ -PFT, le mode d'action et les structures des  $\beta$ -PFT (Figure 27) sont en général mieux compris. Le nombre de monomères impliqués dans l'étape d'oligomérisation varie de quatre monomères pour les actinoporines à cinquante pour les toxines cholestérol-dépendantes [89]. Le diamètre interne des canaux ioniques formés varie donc en fonction du nombre de monomères. Par exemple, l'aérolysine et les actinoporines ont un diamètre interne d'environ 1 à 2 nm, tandis que les pores de la famille des toxines cholestérol dépendantes ont des diamètres pouvant aller jusqu'à plus de 100 nm [89]. La formation du canal ionique est similaire aux  $\alpha$ -PFT sauf concernant la dernière étape. Une partie de la structure de la protéine est dépliée de façon à ce que des feuilletts  $\beta$  provenant de chacun des monomères, puissent être accessibles et forment le domaine transmembranaire. Ce mécanisme se retrouve chez les toxines de la famille de l' $\alpha$ -hémolysine, l'aérolysine, des toxines cholestérol-dépendantes ou encore l'anthrax. Cette dernière toxine est composée de deux sous-unités : l'antigène protecteur (PA) responsable de la formation du canal ionique, et le facteur létal (LF) ou le facteur oedématogène (EF) qui vont être délivrés dans le cytosol.

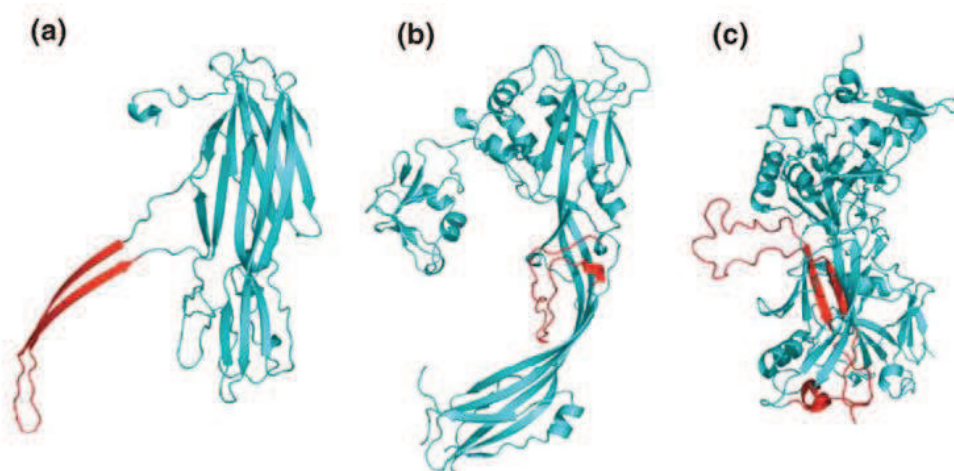
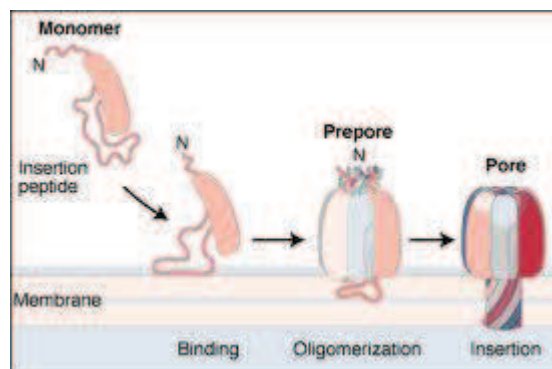


Figure 27 : Structure de 3 monomères de  $\beta$ -PFT, (a) l' $\alpha$ -hémolysine, (b) l'aérolysine et (c) l'antigène protecteur de l'anthrax. [89]

L' $\alpha$ -hémolysine et l'aérolysine, les deux toxines utilisées pour mes études de translocation, sont décrites plus précisément dans les parties ci-dessous.

### L' $\alpha$ -hémolysine

L' $\alpha$ -hémolysine, nommée ainsi pour son activité hémolytique, est une toxine de 293 acides aminés, 33,2 kDa, sécrétée par la bactérie *staphylococcus aureus* sous forme de monomères solubles. Ces monomères se lient à la membrane cellulaire pour, après auto-assemblage de sept unités, former des pré-pores heptamériques (il en existe trois intermédiaires [90]), puis un canal heptamérique, d'un diamètre interne d'environ 1,5nm. La dernière étape de la formation du canal ionique correspond à l'insertion dans la membrane de deux feuillets  $\beta$ , provenant de chaque monomère. Le domaine transmembranaire est donc formé de quatorze feuillets  $\beta$  insérés dans la bicouche lipidique, mais il arrive que l'un des monomères soit défectueux, ce qui entraînerait la formation d'un pore pour lequel seulement douze feuillets  $\beta$  seraient insérés dans la membrane.



**Figure 28 :** Du monomère d' $\alpha$ -hémolysine au canal ionique transmembranaire. [91]

Une fois formé et inséré dans la membrane, le canal entraîne une fuite d'ions, d'eau ainsi que de molécules de bas poids moléculaire [92]. Le canal est maintenu sous sa forme heptamérique grâce aux interactions entre les différents monomères impliquant une centaine de ponts hydrogène et un peu moins d'un millier (environ 850) d'interactions de Van der Waals, lui conférant sa très forte stabilité.

Le canal a une forme rappelant celle d'un champignon, il mesure approximativement 10 nm de longueur et 10 nm de diamètre externe [87]. Il est constitué de trois domaines : la tige (ou stem), le côté le plus fin, la coiffe (ou cap), le côté le plus large (au sommet de l'heptamère) et l'anneau (ou rim), situé en-dessous de la coiffe et à proximité de la membrane. Cet anneau est responsable de la liaison du monomère avec la membrane. La tige mesure 5,2 nm de hauteur et 2,6 nm de diamètre externe mais le canal interne mesure entre approximativement 1,5 nm pour la partie la plus étroite (du côté de la tige) et environ 4,6 nm juste en dessous de la coiffe, bien que le diamètre soit relativement constant à environ 1,8 nm.

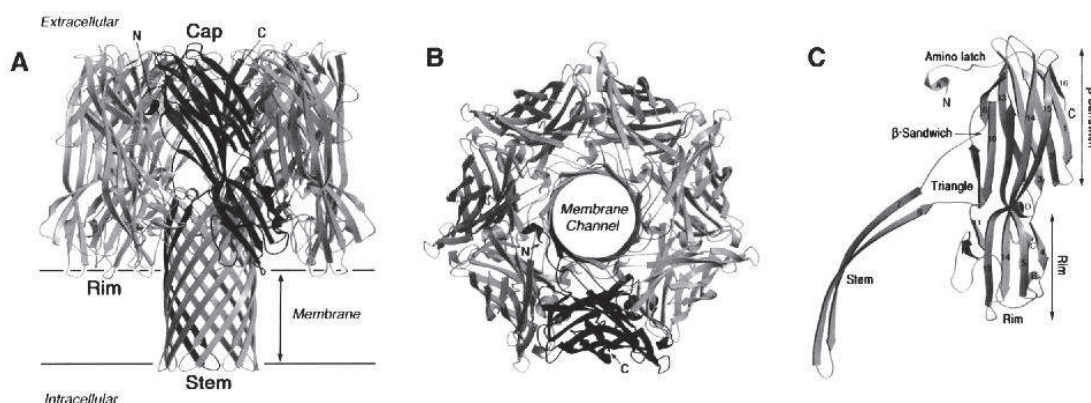


Figure 29 : Vue (A) de face et (B) de dessus du pore d' $\alpha$ -hémolysine. (C) Un monomère d' $\alpha$ -hémolysine. [92]

L'utilisation de ce canal protéique est très répandue dans le domaine des analyses par nanopore, depuis 1996 [50]. Certaines applications de ce nanopore sont présentées dans la partie 1.4.3.

### L'aérolysine

Autre exemple de  $\beta$ -PFT, l'aérolysine est sécrétée par la bactérie *Aeromonas hydrophila* sous la forme d'un précurseur inactif de 52 kDa, appelé proaérolysine. Elle forme des canaux ioniques d'aérolysine, d'environ 47,5 kDa, principalement sélectifs d'anions [93]. Dans le cas des érythrocytes, la formation de l'aérolysine mène à la lyse cellulaire, en passant par un certain nombre de changements comme la perte d'ions et de petites molécules, la vacuolation du réticulum endoplasmique ou encore l'apoptose [94].

Cependant, comparée à l' $\alpha$ -hémolysine, la formation du canal ionique d'aérolysine est plus complexe. La proaérolysine est sécrétée par la bactérie sous forme de dimères [95] qui vont se lier à des récepteurs à la surface de la cellule. Pour les érythrocytes, ces récepteurs sont les glycophorines, des protéines transmembranaires [93]. Une fois à la surface de la membrane cellulaire, les dimères vont pouvoir être activés, ce qui provoquera un changement dans la structure secondaire des monomères, entraînant leur dissociation. Ce changement dans la structure secondaire induit également une augmentation du nombre de feuillets  $\beta$ . L'activation se fait par clivage protéolytique par différents agents, par exemple, par la furine juste avant la sérine 433 [94, 96], par la chymotrypsine après l'arginine 429 ou, plus généralement, par la trypsine après la lysine 427 [93]. Dans le cas d'un clivage par la trypsine, les 43 derniers acides aminés du côté C-terminal sont retirés. Les monomères désormais activés, l'oligomérisation peut avoir lieu pour former un complexe heptamérique amphipathique qui va s'insérer dans la membrane cellulaire. Une fois le canal formé, des études en spectrométrie de masse MALDI-TOF ont montré que la masse moléculaire de l'aérolysine passe de 47,5 kDa pour un simple monomère à environ 334 kDa [97] ce qui montre que l'oligomère d'aérolysine est composé de sept monomères. De plus, mis à part le dimère et l'heptamère, aucun autre oligomère correspondant à différents degrés d'association des monomères d'aérolysine n'a été détecté, l'aérolysine forme donc des pores uniquement heptamériques. De plus, l'aérolysine ne forme pas de pré-pore avant son insertion dans la membrane contrairement aux autres pores de la famille des  $\beta$ -PFT [89]. Après formation de ce complexe, facilitée par la présence des monomères à la surface de la cellule entraînant une augmentation de la concentration des toxines passant d'un espace tridimensionnel à un espace bidimensionnel, il peut s'insérer dans la membrane. Le canal ainsi formé va entraîner la mort de la cellule par lyse osmotique [93, 96, 98].

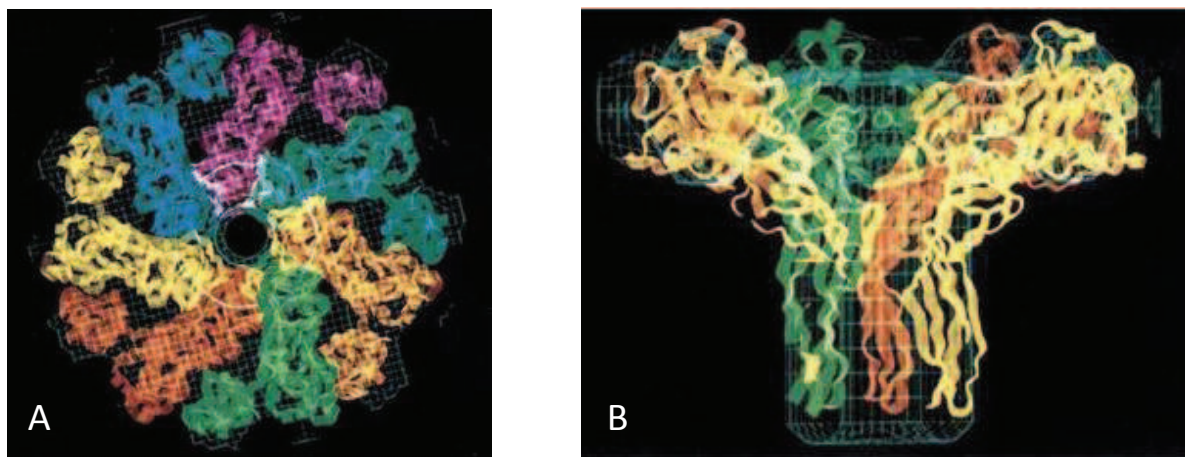


Figure 30 : Vue (A) de dessus et (B) de face du canal ionique d'aérolysine. [87]

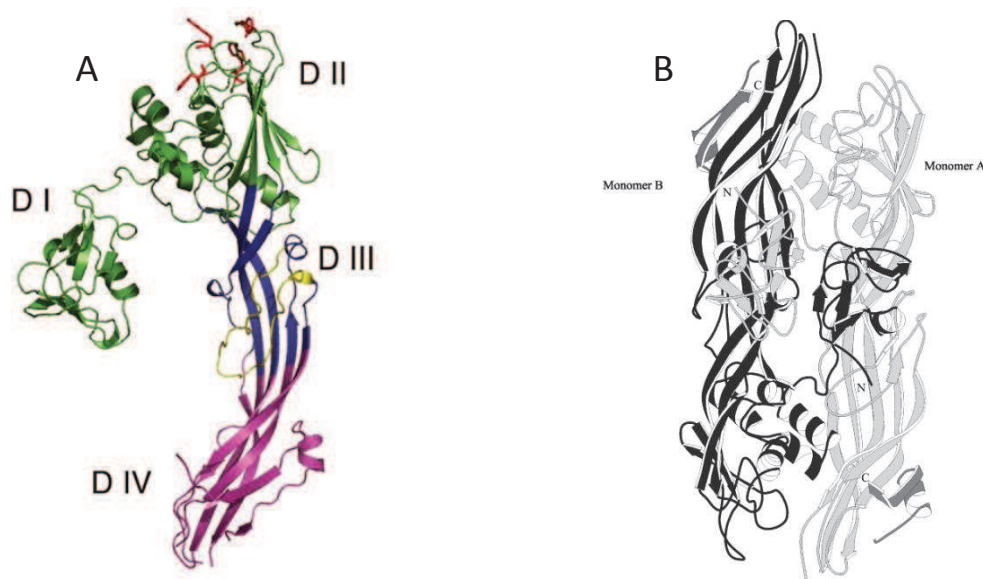
Le monomère de la proaérolysine peut être divisé en deux lobes et quatre différents domaines (Figure 31, A). Le petit lobe, du côté N-terminal, correspond au domaine 1 et le plus grand lobe, plus allongé, contient les trois autres domaines. En solution, la proaérolysine est toujours organisée en dimères (Figure 31, B), avec les deux monomères placés antiparallèlement l'un par rapport à l'autre. Le domaine 1 de chaque monomère est stabilisé par contact avec le domaine 1 de l'autre monomère du dimère et cinq ponts salins ainsi qu'une vingtaine de résidus sont impliqués dans des liaisons hydrogène entre les monomères afin de les maintenir reliés. Après activation du dimère de proaérolysine, au niveau du domaine 4, certains monomères d'aérolysine sont dissociés tandis que d'autres restent assemblés sous forme de dimères [95, 97, 99]. La quantité de ces dimères augmente avec la concentration en toxines en solution mais, à des concentrations inférieures à 1 mg/mL, tous commencent à se séparer en monomères. Certains dimères ne subiraient pas de changement de structure au cours de l'activation, mais ils seraient dissociés avant la formation de l'heptamère, obtenue par association de sept monomères et non par association de dimères. L'organisation des monomères parallèlement les uns aux autres dans l'heptamère et non antiparallèlement comme dans le dimère, conforte l'hypothèse de la dissociation des dimères avant heptamérisation. Chaque monomère apportant trois brins  $\beta$ , l'heptamère est constitué de 21 brins  $\beta$  adoptant une forme de tube pour sa partie transmembranaire.

Le canal d'aérolysine ressemble à celui de l' $\alpha$ -hémolysine mais sans large vestibule. Le disque au sommet du pore d'aérolysine mesure 14 nm de diamètre et repose au dessus de la membrane à une distance d'environ 2 nm. Le diamètre externe du canal est d'environ 4,6 nm tandis que le diamètre interne mesure entre 1 et 1,7 nm. La longueur du canal est de 5 nm auxquels s'ajoutent 3 à 4 nm d'épaisseur du disque, ce qui donne une longueur totale d'environ 8 à 9 nm [100]. Cependant, les essais de cristallisation de l'heptamère d'aérolysine ayant jusque-là été infructueux, ces valeurs ne sont pas très précises. Seul le dimère a pu être cristallisé [95, 99].

Enfin, pour le maintien et la stabilité du canal ionique, les domaines 3 et 4 sont très importants et même nécessaires tandis que les domaines 1 et 2 pourraient être enlevés (après formation du canal) sans provoquer la dissociation de l'heptamère [99]. Ces domaines 1 et 2 ne sont donc pas impliqués dans la stabilité du complexe mais ce sont eux qui permettent l'assemblage initial, le domaine 1 d'un monomère interagissant avec le domaine 2 du monomère voisin. Cette structure confère une importante stabilité à l'heptamère de l'aérolysine [96, 99] qui ne peut être dissocié que difficilement (résiste à 24h d'incubation avec 8M en urée). Cette stabilité est entre autre la raison pour laquelle la trypsine n'entraîne aucun



phénomène de dégradation de l'aérollysine activée, tout en permettant de retirer uniquement le propeptide de la proaérollysine.



**Figure 31 : (A) Monomère de proaérollysine avec les 4 différents domaines : D I, D II, D III et D IV et (B) Proaérollysine organisée en dimère en solution. [101]**

Contrairement à l' $\alpha$ -hémolysine, l'aérollysine n'est que peu utilisée dans le domaine des analyses de molécules par translocation à travers un nanopore. Ceci s'explique par le fait que cette toxine n'est pas disponible commercialement et nécessite donc des étapes préalables de préparation et de purification (Cf. Partie IV.1.2).

#### I.4.2.b. Ingénierie des nanopores biologiques

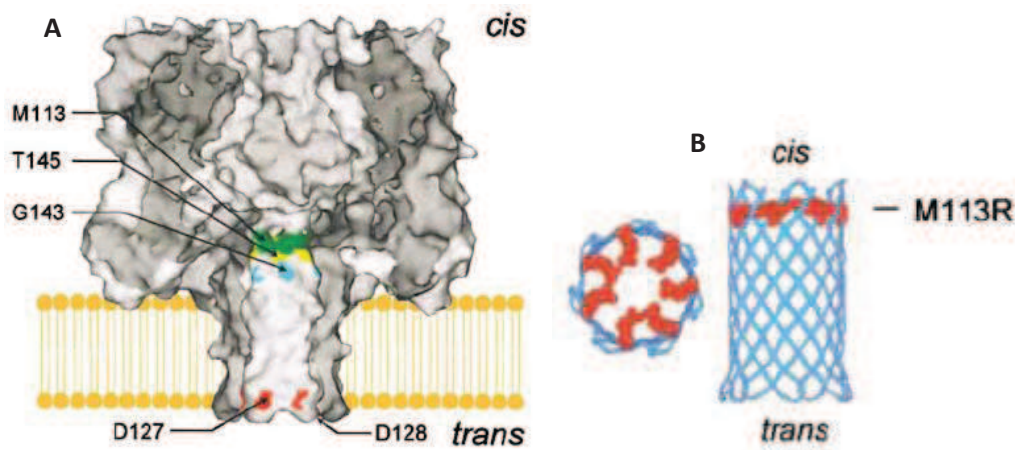
La stabilité de certains pores protéiques permet d'opérer des modifications chimiques. L'intérêt de telles modifications est d'augmenter la sensibilité ainsi que la sélectivité de la technique, de modifier les vitesses de translocation des molécules étudiées ou encore d'augmenter la gamme de taille et de molécules utilisables. En effet, le nanopore d' $\alpha$ -hémolysine, très largement utilisé pour le suivi et l'analyse de la translocation de simples brins d'ADN, n'est pas forcément bien adaptée à l'analyse d'autres composés tels que les protéines ou les polysaccharides. Cependant, le greffage d'agents moléculaires de reconnaissance a permis d'étendre le domaine d'utilisation de l' $\alpha$ -hémolysine [84, 102-106]. Ces modifications peuvent être faites par voie chimique, par mutagenèse ou encore par formation non covalente de structures supramoléculaires. En plus de permettre l'analyse de nouveaux composés, ces modifications améliorent également l'analyse des molécules ciblées en particulier pour le séquençage de l'ADN. Ces dernières années, de nombreuses avancées dans ce domaine ont permis de faciliter et d'améliorer les analyses de petits anions et cations, de molécules organiques, de protéines et de l'ADN.

### *Modification de certains acides aminés par mutagenèse*

Les expériences de modification des pores protéiques par mutagenèse consistent dans le remplacement de certains acides aminés de la toxine ciblée (ces expériences ont majoritairement été faites sur l' $\alpha$ -hémolysine) par d'autres acides aminés. Pour rendre cela possible, la condition primordiale est de connaître la structure de la toxine qui va être modifiée. C'est le cas pour l' $\alpha$ -hémolysine qui a été cristallisée avec succès en 1996 [87]. Par contre, les tentatives de modifications d'autres toxines sont restées sans résultat, même si on commence à trouver des expériences de modification du pore *Mycobacterium smegmatis* porin A (MspA) [107]. Ces acides aminés « remplaçants » sont par exemple l'arginine [104, 108], l'histidine [106, 109] ou la cystéine [110]. Ils peuvent également être insérés à différentes positions dans le pore en fonction du résultat recherché, bien que de nombreuses modifications soient faites au niveau de la constriction du nanopore (Cf. Figure 32), et plus précisément, au niveau de la Méthionine 113 supposée être située précisément au point le plus étroit du canal.

L'ajout de charges positives dans la constriction du canal d' $\alpha$ -hémolysine [104, 111] (et donc autour de la Méthionine 113) permet de fortement ralentir la translocation de molécules d'ADN, les interactions attractives entre l'ADN, négativement chargé, et l'intérieur du pore, rendu positivement chargé, ayant une forte influence sur la vitesse de translocation. En effet, l'ajout de plusieurs anneaux d'arginine (à partir de trois) permet de réduire la durée de translocation d'un facteur 10 et même jusqu'à un facteur 100 lorsque sept anneaux d'arginine sont introduits proche de la constriction du pore. La barrière de potentiel est elle aussi réduite grâce aux charges positives supplémentaires, permettant des analyses à des potentiels inférieurs [111]. La fréquence est ainsi multipliée par 16 dès le premier anneau arginine inséré et n'augmente pas beaucoup plus avec l'ajout d'autres unités, tandis que le courant résiduel, pendant la translocation, est fortement réduit par la réduction du diamètre interne du pore.

L'ajout d'un ou deux anneaux formés par sept résidus d'arginine (soit un résidu arginine par monomère de l'heptamère) permet au pore d' $\alpha$ -hémolysine d'être sélectif aux groupements phosphates [108] tandis que d'autres oxyanions tels que les nitrates, sulfates, citrates et perchlorates n'interagissent pas avec le pore. Cependant, ces blocages ne sont apparents que lorsque les molécules phosphatées sont entraînées à travers le pore depuis son vestibule, le site de blocage n'étant pas accessible depuis l'autre côté (côté « stem » du pore). Les constantes de dissociation des phosphates avec le pore se trouvent énormément diminuées lorsque la molécule contient beaucoup de groupements phosphate. Ainsi, l'adénosine monophosphate (AMP) ne bloque presque pas du tout le pore, l'adénosine triphosphate (ATP) bloque légèrement le pore, tandis que le D-myo-inositol 1,4,5 triphosphate (IP<sub>3</sub>) et le myo-inositol hexaphosphate (IP<sub>6</sub>), possédant de nombreux groupements phosphates, bloquent très fortement le pore.

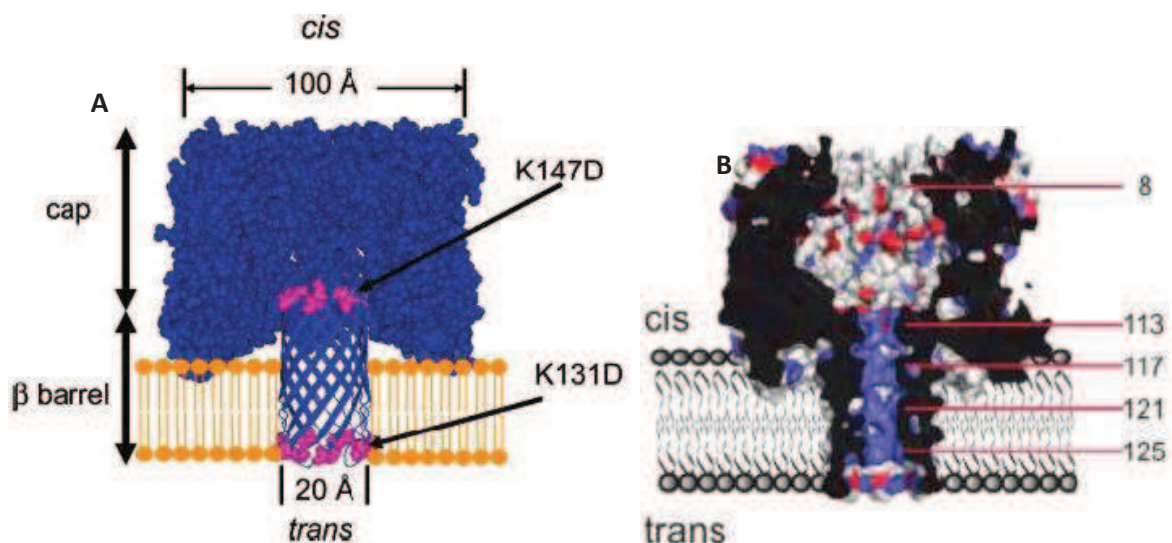


**Figure 32 :** (A) Schéma en coupe de l'α-hémolysine sur lequel les résidus remplacés par mutagenèse sont représentés par différentes couleurs. (B) Vue de dessus et de face du canal transmembranaire contenant un anneau d'arginine à la place des méthionines 113. [108]

La modification de la lysine 8, située à l'entrée du vestibule du nanopore, par une alanine, négative à pH 7 contrairement à la lysine qui est positive à ce même pH, diminue la fréquence de blocage de l'ADN. Ceci est probablement dû à une affinité réduite de l'ADN pour le pore. Si par contre, la lysine 8 est remplacée par une arginine, plus positive, la fréquence est triplée [111].

Bien que les études concernant les modifications de l'α-hémolysine aient principalement concerné les analyses de l'ADN, des études se sont également penchées sur l'analyse de polypeptides [103] ou de métaux divalents [106].

A l'inverse des molécules d'ADN pour lesquelles des charges positives étaient ajoutées au pore d'α-hémolysine, Wolfe *et al.* [103] ont ajouté des charges négatives, apportées par l'acide aspartique à la place d'une lysine, à l'entrée de la tige (sur chacun des sept monomères), en position 131 (les polypeptides étant introduits du côté *trans* de la membrane, Cf. Figure 33, A), K131D et/ou au niveau de la constriction, en position 147, K147D, (Figure 33) pour faciliter l'analyse de polypeptides cationiques.



**Figure 33 :** Deux autres exemples de pores d'α-hémolysine modifiés par mutagenèse, sur différents résidus. [103, 104]



En ajoutant ces charges négatives, le pore devient sélectif aux cations alors qu'il était faiblement sélectif aux anions avant modification. Lorsque l'acide aspartique est présent en position 147, donc que la constriction est plus négative, la majorité des polypeptides étudiés traversent le pore complètement pour passer d'un côté à l'autre du pore. Cela a pour effet de diminuer la barrière énergétique de sortie, augmentant le flux des polypeptides traversant le pore, diminuant leur temps de translocation. La modification de la lysine 131 par l'acide aspartique, à l'entrée du pore induit une diminution de la barrière énergétique d'entrée, entraînant une augmentation de la fréquence de passage à travers le pore. Ces deux modifications étant cumulatives, le mutant avec les deux modifications, K131D/K147D permet une augmentation de la fréquence ainsi qu'une diminution de la durée de translocation. De plus, les interactions peptide-pore dépendent également de la nature de la molécule. Les peptides hydrophiles ont une meilleure affinité pour le pore que les peptides hydrophobes, l'intérieur du pore étant hydrophile.

Braha *et al.* [106] ont montré en 1997 qu'en remplaçant, par mutagenèse, quatre acides aminés situés dans le lumen (à l'intérieur de la partie transmembranaire) du canal par quatre histidines, un site de liaison pour des métaux ioniques divalents était ainsi formé. Ce pore possède 6 monomères d' $\alpha$ -hémolysine naturels (Wild-Type) un septième monomère modifié. Cette modification permet d'analyser les ions divalents présents en solution (Co(II), Ni(II), Cu(II), ...), pour des concentrations nanomolaires, chacun de ces ions entraînant une signature caractéristique : à faible concentration (5  $\mu$ M) en Co(II), les effets sur l'amplitude de courant sont similaires à ceux induits par Zn(II) mais les vitesses d'association et de dissociation sont beaucoup plus faibles. Les ions métalliques peuvent ainsi être identifiés et discriminés.

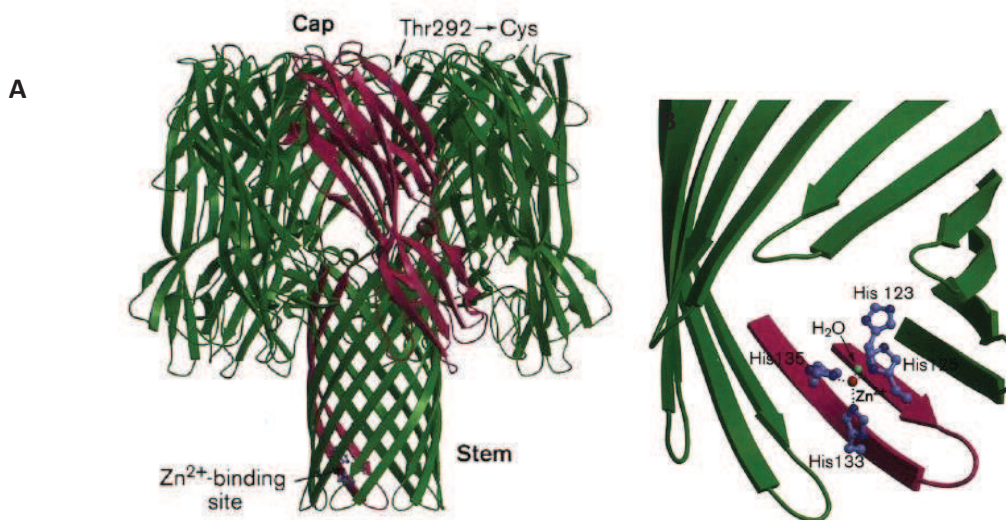


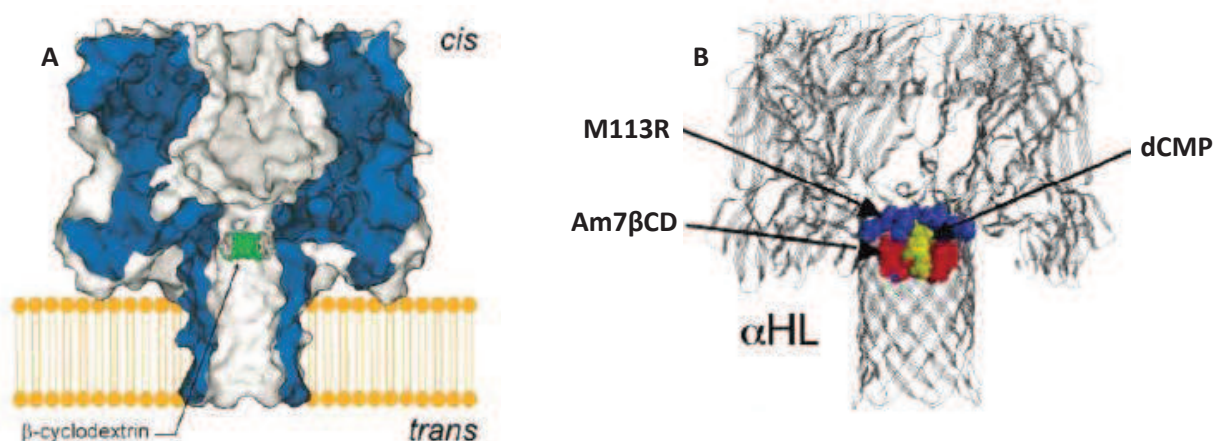
Figure 34 : (A) Vue de face du pore d' $\alpha$ -hémolysine montrant un site de liaison pour les métaux divalents, formés par quatre histidines. (B) Zoom effectué sur le site de liaison. [106]

### Greffage dans le pore

Une autre possibilité d'utilisation des nanopores protéiques est d'attacher, par liaison covalente, un oligonucléotide d'ADN [112, 113] ou un polymère [110]. Dans le cas de l'ADN, différents oligonucléotides sont attachés au pore, sur la cystéine en position 17. Lorsqu'un oligomère, dont la séquence est complémentaire à celui greffé, est introduit en solution, un duplexe se forme dans la cavité interne du pore ce qui augmente le temps de résidence. Cette méthode sera traitée plus en détail dans la partie 1.4.3.a.

### Ajout d'adaptateur dans le pore

L'ajout d'adaptateur dans le pore permet de modifier la conductance d'un canal, de moduler sa sélectivité ionique et permet à de plus petits analytes de s'y associer et s'y dissocier de nombreuses fois, rendant ainsi possible leur détection. La  $\beta$ -cyclodextrine [84, 102, 114-117] mais aussi des peptides cycliques peuvent être utilisés en tant qu'adaptateurs [118]. Les premières expériences utilisant une cyclodextrine dans un pore d' $\alpha$ -hémolysine ont été publiées en 1999 par Gu *et al.* [116]. La cyclodextrine s'insère dans le pore en passant par le côté *trans* de la membrane (tige de l' $\alpha$ -hémolysine), et non par le côté *cis* (vestibule), l'ajout de cyclodextrine n'entraînant aucun effet lorsqu'il a lieu de ce côté. Le diamètre du pore est diminué, se rapprochant plus de la taille des oligonucléotides à analyser, et la conductance est par conséquent réduite, de 57 à 66%, passant par exemple de  $721 \pm 6$  pS, pour l' $\alpha$ -hémolysine seule, à  $253 \pm 4$  pS pour le complexe  $\alpha$ -HL/ $\beta$ -CD, pour une tension de +40mV et à un pH de 7,5 [114]. Cette conductance dépend de la tension appliquée, mais varie très peu avec le pH, contrairement à la durée d'insertion de la cyclodextrine au pore, qui varie fortement avec le pH et la tension appliquée. Ainsi, à -120 mV la cyclodextrine se lie au pore 87 fois plus fortement à pH 5 qu'à pH 11, mais pour une tension appliquée de +120 mV c'est l'inverse qui est observé, la cyclodextrine se lie 150 fois plus fortement à pH 11 qu'à pH 5 [114].



**Figure 35 :** Représentation de pores d' $\alpha$ -hémolysine (A) Wild Type [115] et (B) mutant [117] contenant une  $\beta$ -cyclodextrine proche de la constriction du pore. Sur la figure (B), la  $\beta$ -cyclodextrine est aminée.

L'utilisation de nanopores mutants ((M113R)<sub>7</sub> par exemple, qui possède un anneau de sept arginine près de la constriction du pore [117]) permet d'augmenter la durée d'insertion de la cyclodextrine dans le pore. Les cyclodextrines sont parfois modifiées, par exemple, en remplaçant les sept hydroxyles primaires par des groupements aminés. Ces cyclodextrines aminées se lient plus efficacement aux groupements phosphates des nucléosides monophosphates [117]. En 2001, Hagan Bayley et ses collègues [115] ont modifié la méthionine 113, situé proche de la constriction du pore, par tous les acides aminés naturels existants, changeant ainsi les propriétés de la constriction ainsi que la sélectivité ionique du pore. Ceci leur a permis d'observer de nombreuses différences concernant les durées de résidence d'une cyclodextrine dans le pore, en fonction de chaque acide aminé modifié (Figure 36). Ces durées varient de l'ordre de la milliseconde (0,76 milliseconde à -40 mV) pour l' $\alpha$ -hémolysine avec une méthionine en position 113, jusqu'à plusieurs secondes (27 secondes à -40 mV) lorsque la méthionine 113 est remplacée par une asparagine. Cette modification permet d'obtenir une énergie de liaison de la cyclodextrine jusqu'à  $4,4 \cdot 10^4$



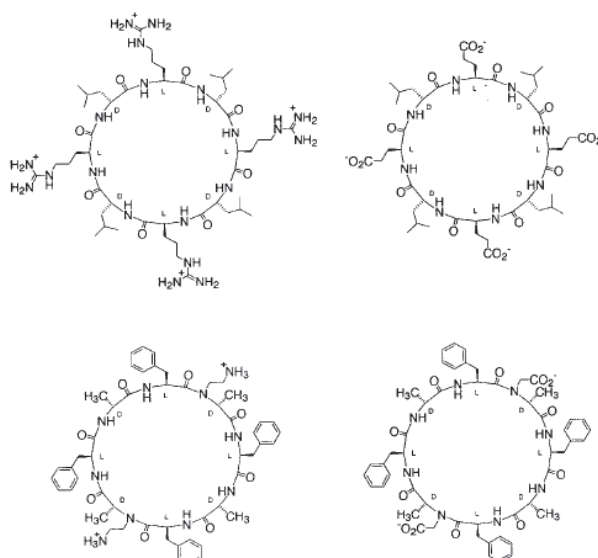


Figure 37 : Exemples de peptides cycliques utilisés come adaptateurs dans le nanopore. [118]

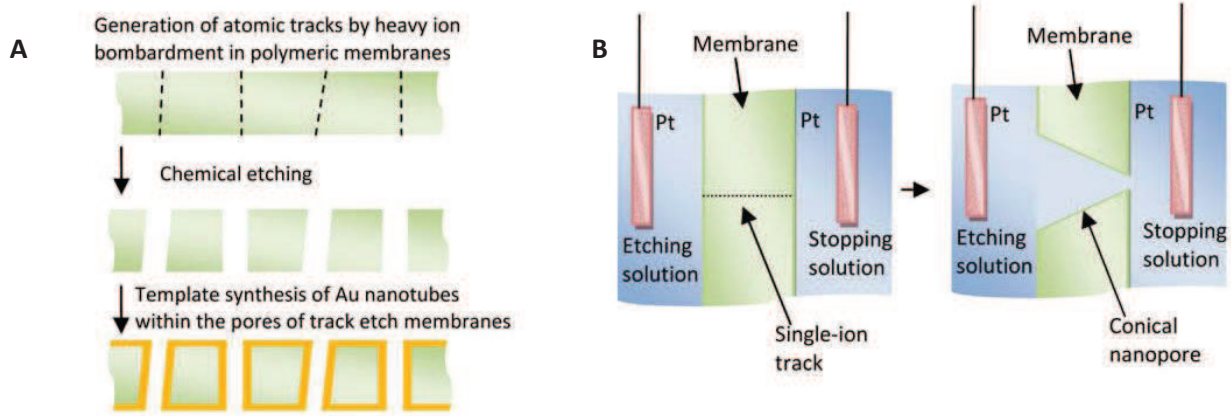
### 1.4.2.c. Les nanopores artificiels

Malgré tous les bénéfices tirés des pores protéiques, il reste de nombreux inconvénients. En effet, le diamètre interne des canaux ioniques n'est pas ajustable et la gamme des tailles disponibles dépend des toxines existantes et utilisables à l'heure actuelle. De plus, la stabilité de la membrane lipidique, bien que suffisante pour certaines analyses, se trouve restreinte à des durées de l'ordre de la journée. Ces limites ont orienté la recherche vers de nouveaux types de nanopores, non plus naturels, mais artificiels.

Ne reposant pas sur des toxines déjà existantes, le diamètre interne des nanopores artificiels peut prendre n'importe quelle valeur souhaitée en fonction des analyses à effectuer. Le diamètre interne minimal du pore qu'il est possible d'atteindre, variant en général du nanomètre à une centaine de nanomètres, dépend de la méthode utilisée pour sa fabrication ainsi que des composés utilisés. La forme et la surface du nanopore est également adaptable en fonction des besoins. On peut donc créer des nanopores dans des membranes hydrophiles ou plutôt hydrophobes.

#### Fabrication

Les premières expériences de nanopores artificiels furent réalisées avec des membranes en polycarbonate contenant de multiples canaux sur lesquelles furent déposées des nanoparticules d'or [119] (Figure 38, A). Puis, l'apparition des nanopores coniques, au lieu de nanopores cylindriques, permit la préparation de nanopores unitaires. Leur fabrication est basée sur une méthode de gravure (etching) sur une membrane isolante ou sur des lames en verre [120]. La gravure se fait à l'aide d'une solution d'alcalins d'un côté et une solution d'acides organiques dans l'autre compartiment pour stopper la réaction de gravure [121] dès la création du pore (Figure 38, B).



**Figure 38 : Différentes techniques de formation de nanopores solides, avec de multiples canaux dans des membranes de type track-etch (A) ou un unique canal conique formé par gravure d'une membrane en verre ou de polymère. [121]**

Une importante avancée de la méthode de fabrication des nanopores artificiels a vu le jour avec le développement de la technique de sculpture par faisceau ionique (Ion Beam Sculpting) par Golovchenko et son équipe à l'université d'Harvard en 2001 [122]. Cette méthode permet de créer des nanopores de 1 à 5 nm de diamètre dans des membranes isolantes de nitrure de silicium. La formation du pore se fait en deux étapes : une cavité d'environ 100 nm est d'abord percée, proche du centre d'une membrane, à l'aide d'un FIB (Focused Ion Beam), puis le côté opposé à cette cavité est aminci par un jet d'argon jusqu'à obtenir une ouverture de quelques nanomètres. Cette étape permet également au pore de se refermer progressivement avec l'augmentation de la durée d'exposition au faisceau ionique grâce à l'accumulation de particules autour du pore. Un diamètre initial de 60 nm a pu être réduit à 1,8 nm [122]. Le diamètre des nanopores est contrôlé en cours de fabrication par TEM (Transmission Electron Microscopy), ce qui permet de contrôler le diamètre du nanopore.

Une autre approche permettant la fabrication de nanopores artificiels de l'ordre du nanomètre est la lithographie à faisceau d'électrons. Un pore d'une vingtaine de nanomètres est formé dans une membrane de silicium Si, SiN ou SiO<sub>2</sub>, par lithographie et gravure, puis, après oxydation thermique, l'exposition du pore à un faisceau d'électrons à haute énergie conduit à une fluidisation de la couche de SiO<sub>2</sub>, qui entraîne une constriction du pore [120, 123]. L'expérience peut être directement suivie par TEM pour contrôler le diamètre du pore. Plus précisément, l'équipe de Cees Dekker a remarqué que les pores d'un diamètre inférieur à 50 nm pouvaient être rétrécis par cette méthode, tandis que les pores d'un diamètre supérieur à 80 nm sont élargis. Ce « diamètre critique » est de l'ordre de l'épaisseur de la membrane dans lequel est percé le pore et dépend également de la géométrie du pore formé. Ainsi, pour des pores formés dans des membranes fines en oxyde de silicium, le diamètre critique en-dessous duquel les pores peuvent être rétrécis n'est plus que de 10 nm. De plus, le processus de rétrécissement du pore est suffisamment lent (environ 0,3 nm par minute) pour pouvoir être stoppé dès que le diamètre voulu est atteint. La précision finale est limitée par la résolution du microscope mais, en pratique, il est impossible de former précisément des pores inférieurs à 1 nm de diamètre à cause de la rugosité de l'oxyde de silicium.



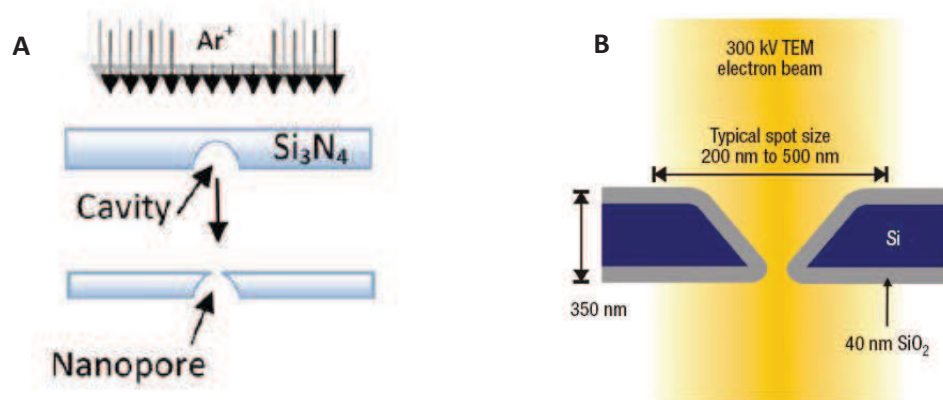


Figure 39 : Nanopores artificiels formés par (A) faisceau ionique FIB [121] et (B) par faisceau d'électrons [123].

Les nanopores sont en général percés dans des membranes isolantes à base de silicium (nitrure de silicium ou en oxyde de silicium) [122, 124-126]. Cependant, les équipes de Golovchenko [127] à Harvard ou C. Dekker à Delft [128] ont récemment utilisé des membranes conductrices en graphène. L'un des avantages est que, contrairement aux membranes en nitrure de silicium dont l'épaisseur est de quelques dizaines de nanomètres, l'épaisseur des membranes de graphène est réduite à quelques couches atomiques. Dans les expériences de Golovchenko, ces fines membranes sont apposées sur une membrane en nitrure de silicium, puis un pore de taille nanométrique est formé à travers la membrane de graphène à l'aide d'un faisceau d'électrons focalisé (focused electron beam).

### Modifications chimiques

L'intérieur des nanotubes peut être modifié chimiquement. Ces modifications peuvent cibler les charges ou la polarité sur la surface interne du pore, ou encore, y greffer des récepteurs permettant une sélectivité moléculaire [121]. Pour des raisons de stabilité, les greffages sont principalement réalisés de façon covalente, en formant des membranes auto-assemblées (SAM : Self Assembled Membrane) avec des molécules de différentes fonctionnalités.

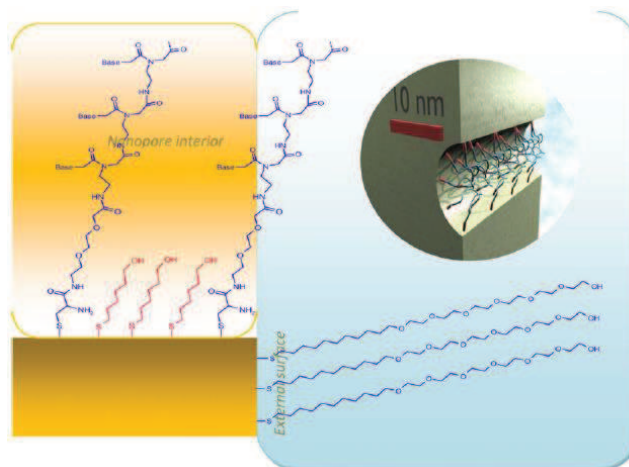


Figure 40 : Modification chimique des surfaces internes et externes d'un nanopore formé dans une membrane d'or. [121]

Recouvrir les nanotubes d'une couche d'or permet la formation de liaisons S-Au, se formant spontanément lorsque les molécules portent des groupements SH ou S-S. Par exemple, attacher des molécules de biotine permet de fixer la streptavidine ou les protéines G pour l'immunoglobuline (IgG). D'après les expériences menées par Z. Siwy *et al.* [129], lorsque les nanotubes en or, modifiés par le greffage de biotines, sont exposés à une solution de lysozyme, la courbe intensité-potentiel (I-V) reste identique à celle obtenue dans le cas d'une solution vierge de protéines. Si par contre, la solution est remplacée par une solution de streptavidine, le courant de blocage tombe à zéro. Ceci est expliqué par le fait que la streptavidine, mesurant environ 5 nm de diamètre, se lie aux parois du nanotube d'or greffé par les biotines (le diamètre interne est également d'environ 5 nm). Le courant ionique ne pouvant donc plus traverser, ces nanotubes d'or greffés par les biotines possèdent donc une spécificité pour la streptavidine.

Pour les membranes en nitrure de silicium, M. Wanunu et A. Meller [130] ont montré qu'il était possible de modifier la charge, la polarité ou la sensibilité au pH du pore en utilisant différentes molécules (possédant des groupes epoxy, amine, acide carboxylique ou aldéhyde ou de type « PEG »). Par exemple, en immergeant un nanopore dans une solution d'acide carboxylique ou d'aldéhyde, les groupements amine à la surface de leurs nanopores étaient convertis en groupements acide carboxylique ou aldéhyde, respectivement. Cependant, ces processus sont compliqués à mettre en œuvre et il existe peu de méthodes permettant de contrôler efficacement le greffage de membranes auto-assemblées dans les nanopores solides. La difficulté de ces techniques étant de contrôler l'épaisseur du film déposé à la surface du pore, de façon à ce qu'il ne soit pas trop épais, au point de boucher le nanopore.

### I.4.3. Applications

Depuis l'expérience pionnière de Kasianowicz *et al.* [50] en 1996, les nanopores ont été utilisés majoritairement pour des analyses d'ADN ou ARN avec pour but leur séquençage. Cependant, certains travaux ont également été consacrés à l'étude de protéines et de leur repliement, de polymères neutres comme le poly(éthylène-glycol), ou d'acides aminés. La technique nanopore est ainsi utilisée comme moyen de détection à l'échelle de la molécule, mais aussi comme un outil pour mesurer les forces mises en jeu lors de la translocation de molécules à travers un pore. On oriente alors le nanopore vers un usage en spectroscopie de force. Toutes ces applications sont détaillées dans les parties ci-dessous.

#### I.4.3.a. Translocation de polymères : analyse des polymères ou du nanopore ?

Les polymères, en général des poly(éthylène glycol) (PEG), ont depuis longtemps été associés aux nanopores, mais ces études étaient principalement faites pour permettre d'accéder aux propriétés physiques de ces canaux ioniques telles que la résistance, les dimensions (internes ou externes) et les changements de volume interne du pore associés aux différents niveaux de conductance [131-136]. Des

informations pouvaient ainsi être obtenues concernant les dimensions internes de pores transmembranaires dont la structure tridimensionnelle n'était pas disponible ou alors pour comparer les données obtenues d'après les données cristallographiques. Les constriction du pore d' $\alpha$ -hémolysine ont également pu être localisées en analysant la translocation de polymères dans un nanopore non modifié [135], ou avec des polymères chimiquement modifiés et un pore modifié par mutagenèse [136, 137]. Concernant l' $\alpha$ -hémolysine, ces données ressemblent à celles obtenues par Song *et al.* en 1996 [87] d'après les données cristallographiques, avec pratiquement le même rayon d'1,2 – 1,3 nm trouvé pour les deux entrées (de chaque côté du pore), une constriction principale d'environ 0,6 – 0,7 nm de rayon et une seconde constriction, située entre l'entrée *cis* et la constriction principale. Des études similaires ont aussi été effectuées sur le pore OmpF, et ont permis des comparaisons entre les pores OmpF,  $\alpha$ -hémolysine et alaméthicine [134]. La translocation des polymères était donc initialement utilisée principalement pour analyser le nanopore utilisé et non la molécule le traversant.

L'influence de la concentration ionique de la solution a également été étudiée [135, 138]. L'augmentation de la concentration saline améliore la sensibilité des analyses à l'aide de nanopores protéiques, permettant une augmentation du rapport signal/bruit, diminuant la concentration minimale nécessaire pour la détection d'analytes et affinant leur identification. La fréquence des événements ainsi que leur amplitude et leur durée augmentent également avec la concentration en KCl. Par exemple, pour un PEG 2000, la fréquence d'événements est 2000 fois supérieure à 4M KCl qu'à 1M KCl [138]. L'augmentation de la concentration saline induit également une diminution des répulsions entre les molécules de PEG et l'intérieur du pore, entraînant des interactions hydrophobes plus fortes. L'augmentation de ces interactions résulte en une augmentation des temps de résidence des molécules de PEG dans le pore et donc de la durée de translocation. A l'inverse, à faible concentration ionique, aucune interaction entre les PEG et l'intérieur du pore n'est observée [139]. Ceci, ajouté au fait que les fréquences d'événements trouvées à 40 mV pour Rodrigues *et al.* [138] sont environ cinq fois plus faibles que celles trouvées à 100 mV par Movileanu *et al.* [139], suggère que l'entrée des PEG dans un pore d' $\alpha$ -hémolysine peut être dépendante de la tension appliquée, ce qui implique que les PEG se comportent comme des molécules chargées, en complexant des cations présents en solution [138, 140].

Les premiers travaux ont porté sur l'influence des interactions PEG / membrane sur le bruit du courant ionique. Les études de Bezrukov *et al.* de 1994 [133] et 1996 [131] font partie des premières études impliquant la translocation de polymères dans des nanopores protéiques. Elles montrent l'évolution de la densité spectrale du courant (Figure 41, A), servant à quantifier l'intensité du bruit induit par les polymères, en fonction de la taille des PEG se trouvant en solution à proximité du pore, et montrent un maximum pour des PEG de masse molaire 2000 g/mol environ pour une tension appliquée de 100 mV et à des concentrations en PEG de 15%.

Les études plus récentes s'intéressent aux différents blocages de courant induits par les passages de polymères [139, 141] plutôt qu'au bruit électrique qu'ils provoquent. La fréquence des événements et leur durée ont ainsi été observées, et sont dépendantes de la masse molaire des PEG et/ou de leur concentration. La fréquence est dépendante de ces deux paramètres tandis que le temps de translocation des molécules augmente avec la masse molaire mais est indépendante de la concentration. Par exemple, à 3 mM en polymères, les PEG 940, PEG 2000 et PEG 3100 ont des fréquences respectives de  $120 \pm 10$  Hz,  $26 \pm 2$  Hz et  $3,6 \pm 0,6$  Hz. Les durées d'événements pour des PEG 940 à 6000 augmentent également mais de façon moins prononcée, passant de  $60 \pm 7$   $\mu$ s pour le plus petit polymère, à  $120 \pm 10$   $\mu$ s pour le plus long. Ces résultats laissent penser que les polymères de PEG sont compacts lorsqu'ils traversent le pore [139]



mais tout ceci n'est valable que dans le cas d'un régime dilué. Des expériences ont été menées par Oukhaled *et al.* [141] dans un régime semidilué. Les concentrations en PEG sont plus importantes, et des interactions polymères-polymères existent donc dans ce régime. Ceci a pour avantage de permettre la translocation de très longues molécules de PEG (jusqu'à 200 kDa) en forçant l'entrée de ces longues chaînes dans le pore par pression osmotique. La translocation n'est possible qu'à partir d'une concentration seuil égale à  $24 \pm 2,6$  % pour le PEG 35kDa (Figure 41, B, points rouges).

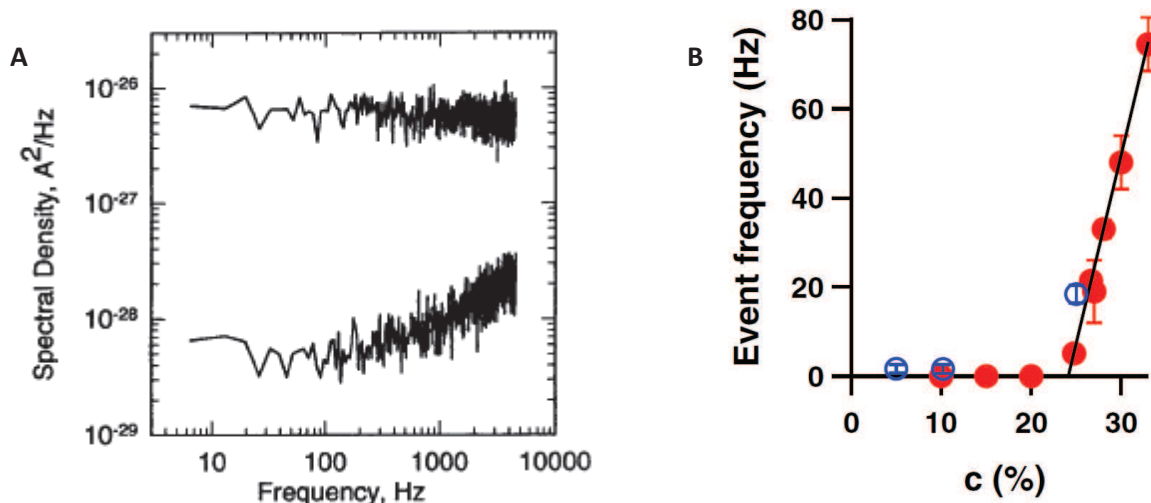


Figure 41 : (A) Analyse de la densité spectrale en présence (en haut) et en l'absence (en bas) de PEG 1000 en solution [131]. (B) Evolution de la fréquence des événements en fonction de la concentration en polymères pour un PEG 35kDa [141].

Ces méthodes ont pour point commun l'étude des polymères se trouvant en solution, et passant à travers un pore. Howorka *et al.* [110] ont étudié des poly(éthylène glycol) (PEG), de tailles différentes (5000 et 3000 g/mol). Ces polymères sont attachés un à un, de façon covalente, à deux différents endroits du canal : la lysine 8 (H<sub>6</sub>K8C) ou la sérine 106 (H<sub>6</sub>S106C) sont modifiées par une cystéine, sur laquelle va se lier le polymère.

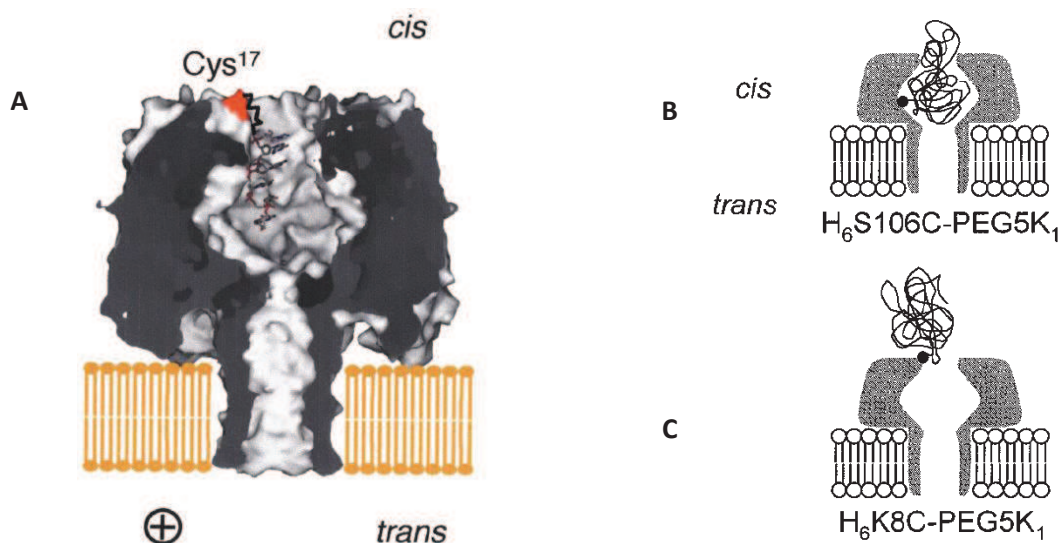


Figure 42 : Pores d' $\alpha$ -hémolysine modifiés par une cystéine en position 17 (A) permettant de lier un oligonucléotide au pore [113], en position 106 (B) ou en position 8 (C) pour y lier une molécule de PEG [110].

Dans le premier cas, la lysine 8 se trouvant à l'entrée du vestibule ([Figure 42, C](#)), le polymère se trouve majoritairement en dehors de la cavité interne du nanopore tandis que dans l'autre cas, le polymère est confiné à l'intérieur du canal ([Figure 42, B](#)). Les mouvements du polymère ainsi attaché sont ensuite étudiés et comparés. Les analyses de courant électriques, faites pour les deux polymères avec le pore H<sub>6</sub>S106C, montrent deux types d'événements, certains longs de plusieurs secondes et d'autres de l'ordre de la milliseconde. Les résultats montrent que les chaînes de PEG sont flexibles et que les propriétés dynamiques des PEGs ou autres polymères peuvent être analysées de cette façon.

#### I.4.3.b. Séquençage d'acides nucléiques

##### *L'expérience pionnière de Kasianowicz*

En 1996, Kasianowicz *et al.* [50] utilisèrent un pore d' $\alpha$ -hémolysine pour analyser des molécules d'ADN et d'ARN en vue de mettre au point une méthode de séquençage rapide. Le pore est suffisamment large pour permettre le passage des simples brins mais est trop petit pour permettre le passage des doubles brins (de 2,2 nm de diamètre). Suite à leurs analyses, ils trouvèrent trois types de blocage de courant, le premier correspondant aux molécules interagissant avec le pore mais sans le traverser, et les deux autres correspondant l'un aux molécules traversant dans le sens 3'-5' et l'autre aux molécules traversant dans le sens 5'-3'. Ce comportement a également été observé et confirmé par la suite [142-145]. Ces deux blocages dépendent de la longueur et du type du polymère et leur durée est inversement proportionnelle à la tension appliquée, tandis que les blocages correspondant aux chocs des molécules contre le pore ne dépendent ni de l'un ni de l'autre. Kasianowicz et son équipe ont estimé que cette méthode pourrait peut-être permettre le séquençage d'ADN si cinq conditions sont réunies :

- ✓ chaque nucléotide doit engendrer un courant de blocage caractéristique différent des autres nucléotides,
- ✓ le canal doit être de dimensions appropriées pour permettre de différencier les nucléotides un par un,
- ✓ la durée des mesures doit excéder la durée de passage d'un nucléotide à travers le pore,
- ✓ le mouvement des polynucléotides à travers le pore doit être majoritairement à sens unique,
- ✓ la membrane lipidique ainsi que le canal inséré doivent être suffisamment stables et robustes pour permettre les analyses nécessaires à différentes températures ou avec différents agents chimiques.

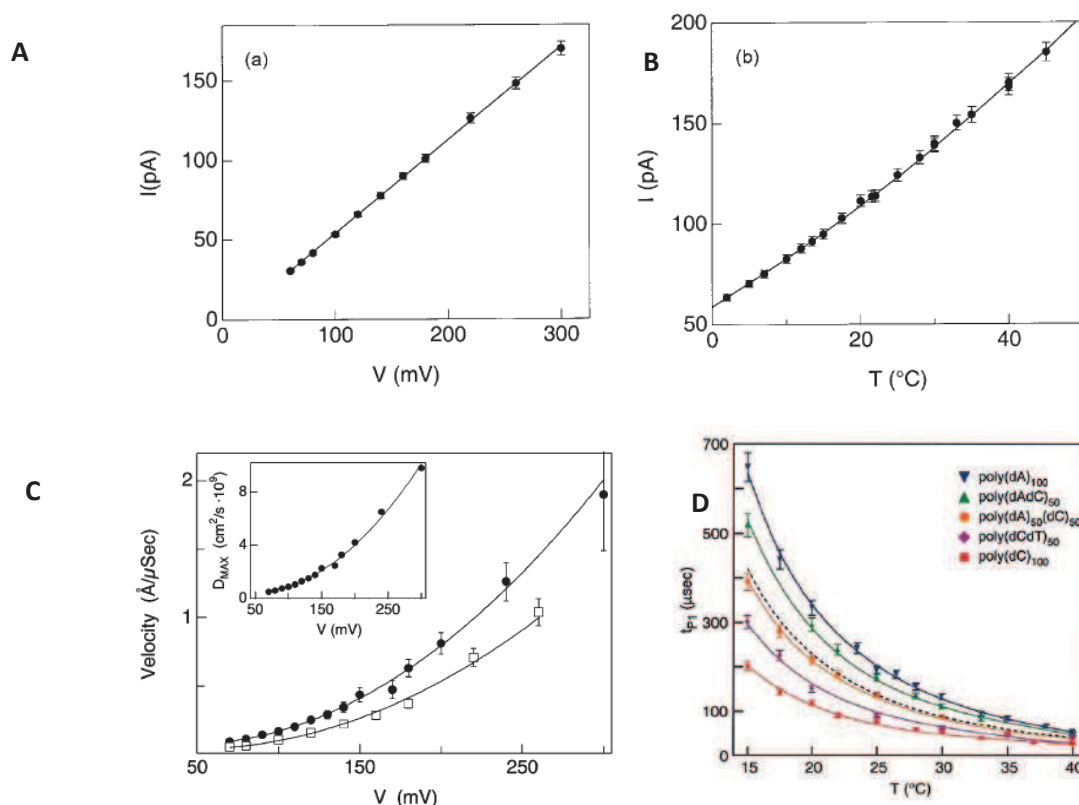
Depuis lors, de nombreuses études ont tenté de reproduire et d'améliorer le séquençage de polynucléotides. Cette approche peut être envisagée aussi pour d'autres biopolymères comme les protéines et les polysaccharides, bien que très peu d'études aient été décrites à ce jour.

### Contrôle du transport par modification biochimique

Il existe différentes méthodes possédant chacune leurs avantages mais aussi leurs inconvénients. Par exemple, le nanopore peut être protéique [143, 146, 147] (les simples brins d'ADN ou ARN peuvent être correctement analysés mais les doubles brins ne peuvent pas traverser le faible diamètre interne de ces pores) ou synthétique [148-152] (les doubles brins peuvent cette fois être analysés si le diamètre du pore est supérieur au diamètre du double brin mais cela réduit les interactions entre les simples brins et l'intérieur du pore), il peut contenir ou non un adaptateur [84, 117] (une cyclodextrine par exemple) ou une molécule greffée dans le lumen [113]. Les molécules sont analysées en observant leurs translocation à travers le pore, en les immobilisant dans le pore à l'aide d'un complexe streptavidine/biotine [85, 144, 153-155] ou encore en ralentissant leur translocation à l'aide d'une épingle à cheveu [156, 157], d'une polymérase [107, 158-161], d'une mutagenèse dirigée [104] ou d'ajout de tags chimiques aux différentes bases pour augmenter les blocages stériques [162]. Si le nanopore est protéique, la majeure partie des études correspondantes ont été faites avec de l' $\alpha$ -hémolysine. Cependant, depuis quelques années certains groupes utilisent le pore *Mycobacterium smegmatis* porin A (MspA), dont la constriction est plus petite, environ 0,6 nm de longueur et 1,2 nm de diamètre [107, 163-165], ou encore l'aérolysine [166-168].

### Contrôle du transport par des paramètres physiques

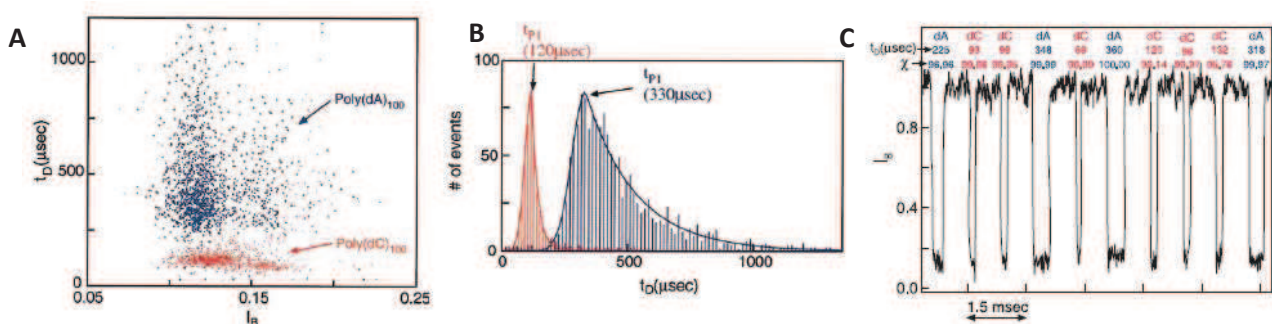
En plus des paramètres structuraux du nanopore ou des molécules utilisées cités ci-dessus, différents paramètres peuvent être optimisés pour améliorer la détection des polynucléotides, tels que la viscosité contrôlant la dissipation visqueuse [169, 170], la tension appliquée pour la force électrique [171] ou la température pour l'agitation thermique [143, 172].



**Figure 43 :** Evolution de différents paramètres : le courant de pore ouvert en fonction de (A) la tension et de (B) la température, la vitesse des molécules en fonction de la tension (C) et le temps de translocation de différents polynucléotides en fonction de la température (D). [172]

Ces paramètres influent sur l'intensité du courant ionique mais également sur la durée de translocation des molécules à travers le pore. Ainsi, en augmentant la tension appliquée ou la température, le courant observé augmente [172] (Figure 43, A et B). Cependant, la tension et la température influent également sur la vitesse et donc la durée de translocation des molécules. Plus la température et la tension seront élevées, plus les molécules vont passer rapidement à travers le pore (Figure 43, C et D).

Cependant, ces différents paramètres ne doivent pas nécessairement être modifiés pour pouvoir discriminer un mélange de bases d'ADN ou d'ARN, les différentes bases d'ADN ou d'ARN étant discernables à température ambiante et sans modifier la viscosité de la solution. Amit Meller *et al.* [143] et Mark Akeson *et al.* [146] ont ainsi étudié les comportements en solution de différents polynucléotides d'ADN ou d'ARN, d'homopolymères ou de copolymères à blocs et également de mélanges d'homopolymères d'ADN et d'ARN. D'après la courbe Figure 43, D, plus la température est élevée, plus les temps de translocation d'un poly(dA)<sub>100</sub> et d'un poly(dC)<sub>100</sub> sont similaires. A l'inverse, plus la température est faible et plus les différences concernant les temps de translocation s'accroissent. En se basant sur ce paramètre, il est donc plus facile de distinguer les blocages correspondant à des poly A de ceux correspondant à des poly C, lorsque les expériences sont faites à basse température [143].

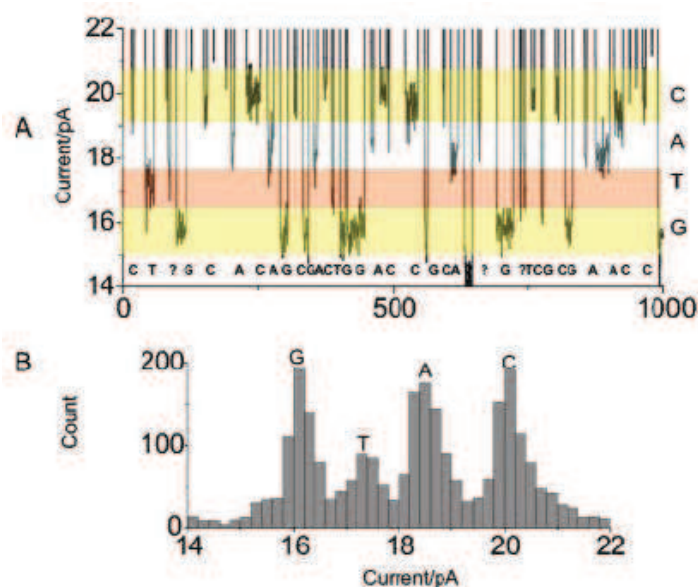


**Figure 44 :** (A) Nuage de points représentant le temps de translocation de deux différents polynucléotides (Poly(dA)<sub>100</sub> en bleu et Poly(dC)<sub>100</sub> en rouge) en fonction de l'intensité de blocage résultante. (B) Histogramme des durées d'événements pour les deux mêmes polynucléotides. (C) Trace de courant montrant la possibilité de discriminer les molécules de poly(dA)<sub>100</sub> des poly(dC)<sub>100</sub> d'après leur temps de translocation. [143]

Des études ont aussi été portées sur la détection de l'ARN. On distingue des temps de translocation différents ( $5 \pm 2$  µs par nucléotide pour un poly C contre  $22 \pm 6$  µs par nucléotide pour un poly A). Les intensités de blocage peuvent aussi être différentes entre les poly A, qui bloquent le courant à environ 85% du courant de base, et les poly C qui bloquent le courant plus intensément, à environ 91 et 95% [146]. Bien que les pyrimidines des poly C soient plus petites que les purines des poly A, elles induisent des courants de blocage plus importants. En effet, à température ambiante et à pH neutre, les poly C se trouveraient principalement sous la forme d'une hélice d'1,3 nm de diamètre, tandis que les poly A sont sous la forme d'une hélice plus grande, d'un diamètre de 2,1 nm environ. Les poly A peuvent donc entrer dans le vestibule du pore d' $\alpha$ -hémolysine mais ont besoin de plus de temps pour s'étirer et se dérouler afin de traverser le canal transmembranaire plus fin du pore. De même, les poly C et les poly dC n'ont pas la même intensité de blocage (91 et 95% et 86 et 89% respectivement) et ne présentent pas non plus les mêmes durées de translocation (environ 750 µs pour un 130-mer poly C et environ 100 µs pour un 100-mer poly dC) ce qui permet de les différencier facilement. De plus, la conformation en hélice des poly dC serait moins stable que celle des poly C et aurait donc besoin de moins de temps pour trouver la bonne conformation pour traverser le pore.

### Utilisation d'un adaptateur dans le pore d' $\alpha$ -hémolysine

L'insertion d'une amino-cyclodextrine (heptakis-(6-deoxy-6-amino)- $\beta$ -cyclodextrine) dans la cavité d'un mutant de l' $\alpha$ -hémolysine (M113R) a permis une amélioration de l'analyse et la distinction des quatre 2'-désoxyribonucléoside 5'-monophosphate (dNMP) et également des quatre 2'-ribonucléoside 5'-monophosphate (rNMP) selon le taux de blocage résultant de leur translocation à travers le complexe  $\alpha$ -HL/ $\beta$ -CD [117]. Quant aux temps de translocation, ils sont trop similaires pour être utilisés. Chaque dNMP entraîne un courant résiduel qui lui est propre, compris, à +130 mV, entre  $16,2 \pm 0,5$  pA pour les bases G et  $20,2 \pm 0,5$  pA pour les bases C. La tension de +130 mV correspond à la tension optimale, pour laquelle la résolution est la meilleure. L'ajout des quatre dNMP simultanément montre également quatre amplitudes de blocage différentes, permettant la discrimination entre chacune des bases A, T, C et G (Figure 45). Les quatre rNMP ont été discriminés de façon similaire. La précision de ces mesures est supérieure à 93%.



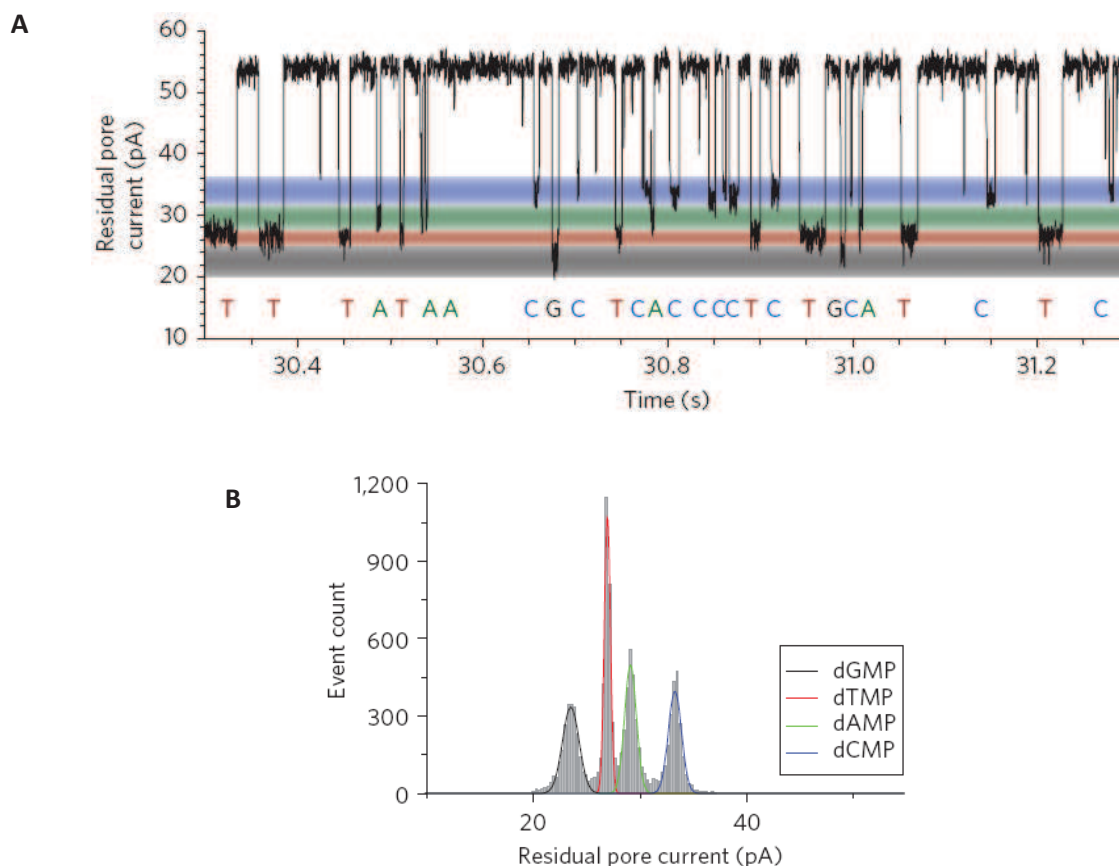
**Figure 45 :** (A) Trace de courant correspondant à un mélange des quatre dNMPs passant à travers un pore d' $\alpha$ -hémolysine modifié (M113R) dans lequel se trouve une amino-cyclodextrine. (B) Histogramme des intensités de blocage montrant la possibilité de discriminer les quatre dNMPs d'après leur intensité de blocage. [117]

Plus récemment, le pore d' $\alpha$ -hémolysine a été modifié par mutagenèse pour améliorer cette discrimination [84] : les résidus méthionine 113, leucine 135 et asparagine 139 sont modifiés par des résidus arginine, cystéine et glutamine respectivement. Alors que la modification des résidus 113 et 139 est faite sur chacun des 7 monomères, celle du résidu 135 n'apparaît que sur l'un d'eux uniquement. La cyclodextrine utilisée est modifiée ( $\text{am}_6\text{amPDP}_1\beta\text{CD}$ ) par des groupements aminés remplaçant les hydroxyles primaires, sauf un qui est remplacé par un groupement dithiopropanoyl, permettant la liaison covalente de la cyclodextrine à une cystéine du pore pour augmenter le temps de résidence de la cyclodextrine dans le pore.

La discrimination des désoxyribonucléosides monophosphates a été testée pour des concentrations salines en KCl de 350 à 1000 mM, des températures comprises entre 15 et 40°C, une gamme de pH entre 6,0 et 8,5 et une variation du potentiel appliqué. Chaque nucléotide traversant le pore entraîne une signature caractéristique qui lui est propre, mais les temps de translocation étant sensiblement les mêmes (sauf pour dTMP, dont les temps sont deux à trois fois supérieurs aux temps des autres dNMP), les nucléotides sont discriminés en fonction de leur courant de blocage du pore (Figure 46, A et B). En-dessous

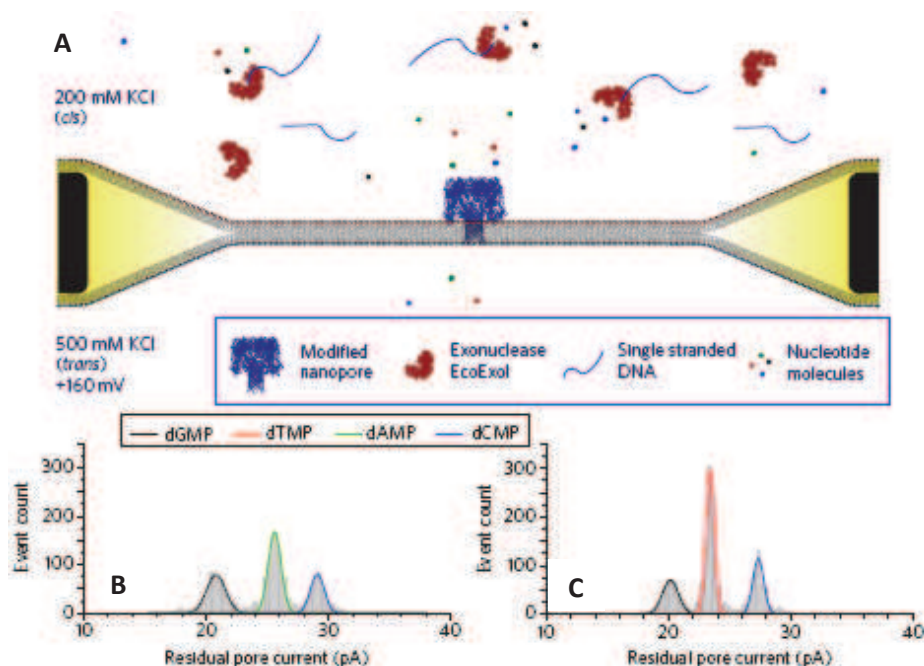


de +120 mV, les dNMP ne traversent pas le pore et ressortent donc du même côté de l'entrée, tandis qu'au-delà de +120 mV, les dNMP traversent complètement le pore, ce qui est nécessaire pour que le même dNMP ne soit pas analysé deux fois par le pore, entraînant un séquençage erroné. La tension optimale pour une meilleure discrimination des bases a été trouvée pour une valeur de +180 mV.



**Figure 46 :** (A) Trace de courant plus précise, montrant la discrimination entre les quatre dNMPs traversant un pore d'α-hémolysine modifié et contenant une amino-cyclodextrine modifiée également. (B) Histogramme des intensités de blocage des différents dNMPs. [84]

Après avoir confirmé que les différents dNMP mélangés en solution sont aisément discriminables et reconnaissables, la seconde partie de cette étude a été consacrée à l'analyse d'un simple brin d'ADN ayant subi un clivage enzymatique à proximité de l'entrée du nanopore. Pour cela, les conditions salines de l'expérience ont été adaptées de manière à ne pas diminuer l'activité enzymatique. La concentration en KCl dans le compartiment *cis* est de 200 mM et 500mM pour le compartiment *trans* pour maintenir une haute conductivité ionique et donc maintenir une bonne discrimination des bases. Deux brins d'ADN (un 85mer contenant uniquement des bases G, A et C et un 76mer contenant uniquement des bases G, T et C) et l'exonucléase ExoI ont été ajoutés en solution dans le compartiment *cis* pour être analysés, séparément. Chaque base, coupée par l'exonucléase, traverse le pore et est détectée comme le montrent les histogrammes des courants de blocage (Figure 47, B et C).



**Figure 47 :** (A) Schéma montrant le pore d'α-hémolysine, les brins d'ADN et l'exonucléase EcoExol en solution. (B) et (C) Histogrammes des intensités de blocage de chacun des différents nucléotides provenant de simples brins d'ADN. [84]

Cependant, toutes ces méthodes présentent le même défaut d'une vitesse trop rapide de translocation des molécules. Elle est d'environ 1 nucléotide toutes les 3  $\mu$ s [161] ce qui est beaucoup trop important pour permettre un séquençage précis de l'ADN en temps réel. Pour cela, plusieurs groupes ont essayé différentes méthodes afin de ralentir la translocation des bases, pour améliorer cette technique de détection.

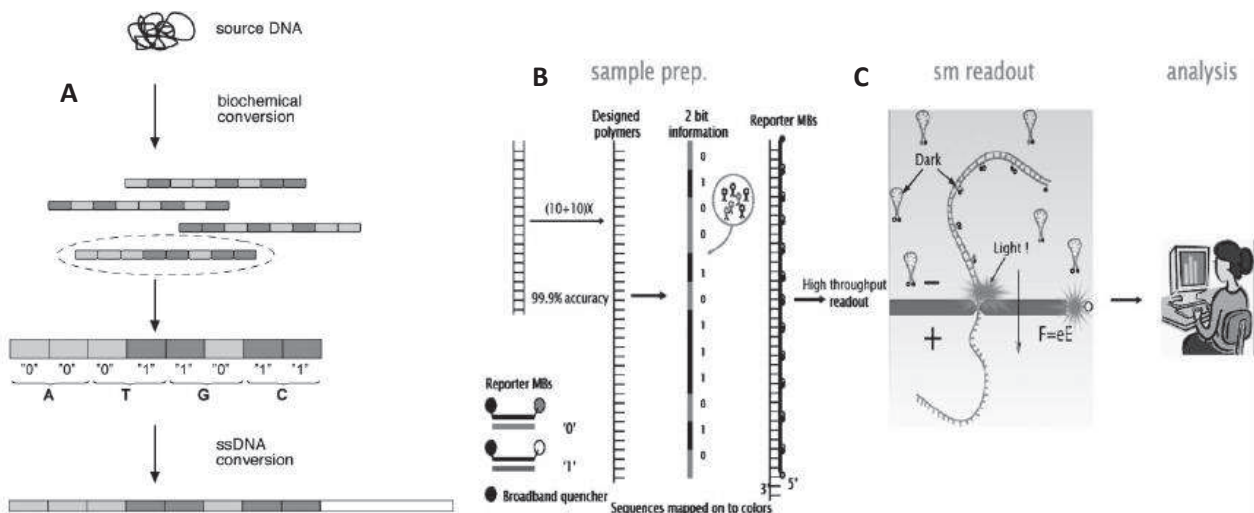
### Méthodes pour ralentir la translocation des acides nucléiques

Ces méthodes sont assez nombreuses. Il est possible de diminuer la température ou la tension, ou de modifier la viscosité de la solution en y ajoutant différentes concentrations en glycérol [169, 170], ce qui permet de réduire la vitesse de translocation des bases d'un facteur 10 à 20 environ (par exemple un poly(dC)<sub>50</sub> voit sa vitesse de translocation décroître d'environ 1  $\mu$ s par base [146] à  $22 \pm 10$   $\mu$ s par base [170]). Cependant l'avantage gagné par la réduction des vitesses de translocation est contrebalancé par la diminution des courants mesurés, ce qui complique les analyses. Il est également possible d'utiliser une polymérase couplée à un nanopore [158, 159, 173], des épingles à cheveux [147, 156, 174], des complexes streptavidine/biotine [85, 154, 155].

D'autres moyens sont soit de modifier le pore comme décrit dans la partie 1.4.2.b, soit de modifier les molécules le traversant. Si ce sont les molécules qui sont modifiées, il y a deux possibilités. La première consiste à attacher des tags chimiques aux différentes bases des molécules à analyser de façon à causer des blocages stériques lorsque ces bases modifiées vont traverser le pore [162], tandis que la seconde option, présentée par Gautam V. Soni et Amit Meller [175], utilise un couplage entre un nanopore protéique et un microscope à fluorescence. La séquence de chacune des molécules d'ADN est amplifiée, augmentant leur longueur d'un facteur 20. Les molécules deviennent ainsi plus facilement détectables. Chaque nucléotide est remplacé par un code binaire (adénine = 00, cytosine = 01, guanine = 10 et thymine = 11) ce qui permet

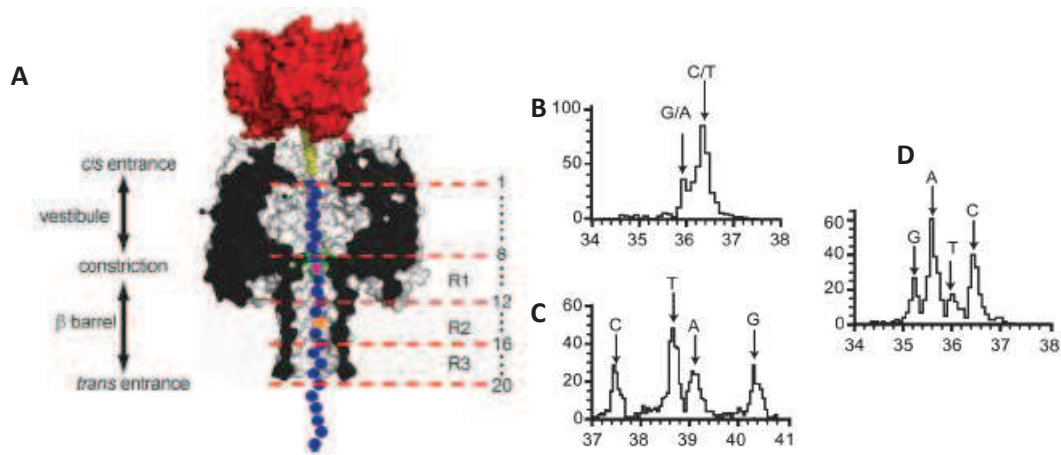


de simplifier l'analyse en ne repérant que les codes 0 ou 1 au lieu des quatre bases de l'ADN. Un second brin d'ADN, comportant des balises fluorescentes, et complémentaire à la séquence codée, est ajouté pour les hybrider. La première étape de cette méthode est la translocation des molécules à travers le pore d' $\alpha$ -hémolysine. La molécule étant un double brin, elle ne peut traverser et on observe son dégrafage ce qui ralentit sa translocation. Au cours du dégrafage de la molécule, les balises fluorescent de deux façons différentes, on obtient une lumière rouge ou verte en fonction du code 0 ou 1. Lorsque la molécule a totalement traversé le pore, il suffit de décoder la séquence de couleur observée pour retrouver la molécule d'ADN codée et donc la séquence de la molécule ayant traversé le pore.



**Figure 48 :** (A) Codage de la molécule source d'ADN en un simple brin d'ADN plus long. (B) Préparation de la molécule à analyser avec les balises présentes à différents endroits pour pouvoir être vues lorsqu'elles fluorescent (C) . La séquence initiale peut ensuite être retrouvée. [175]

Les molécules peuvent également être modifiées par un groupement empêchant la translocation comme une portion ADN en épingle à cheveux (un motif structural consistant en deux brins reliés par une petite boucle) ou une streptavidine reliée à l'aide d'une biotine sur la molécule à étudier. L'utilisation d'une streptavidine empêche totalement la molécule d'ADN de traverser le pore. Les molécules étudiées sont donc stoppées à l'intérieur du pore. Ceci a permis au groupe d'Hagan Bayley [85, 153-155] de mieux étudier le pore d' $\alpha$ -hémolysine, tout en essayant de mieux discriminer les différentes bases de l'ADN placées à différentes positions dans le pore. Ils ont ainsi montré que des bases se trouvant dans le vestibule du pore, en positions 1 à 5 juste après la streptavidine (Figure 49, A) n'influencent pas le courant de blocage contrairement aux autres bases situées entre les positions 6 et 20. Cela leur a également permis de voir qu'il existe trois différents sites de reconnaissance au sein du canal transmembranaire (notés R1, R2 et R3 sur la Figure 49, A) chacun permettant une discrimination des bases plus ou moins marquée. En utilisant cette méthode, les modifications épigénétiques de l'ADN (modification de la Cytosine C par la 5-méthylcytosine 5mC ou par la 5-hydroxyméthylcytosine hmC) sont également reconnaissables [153].

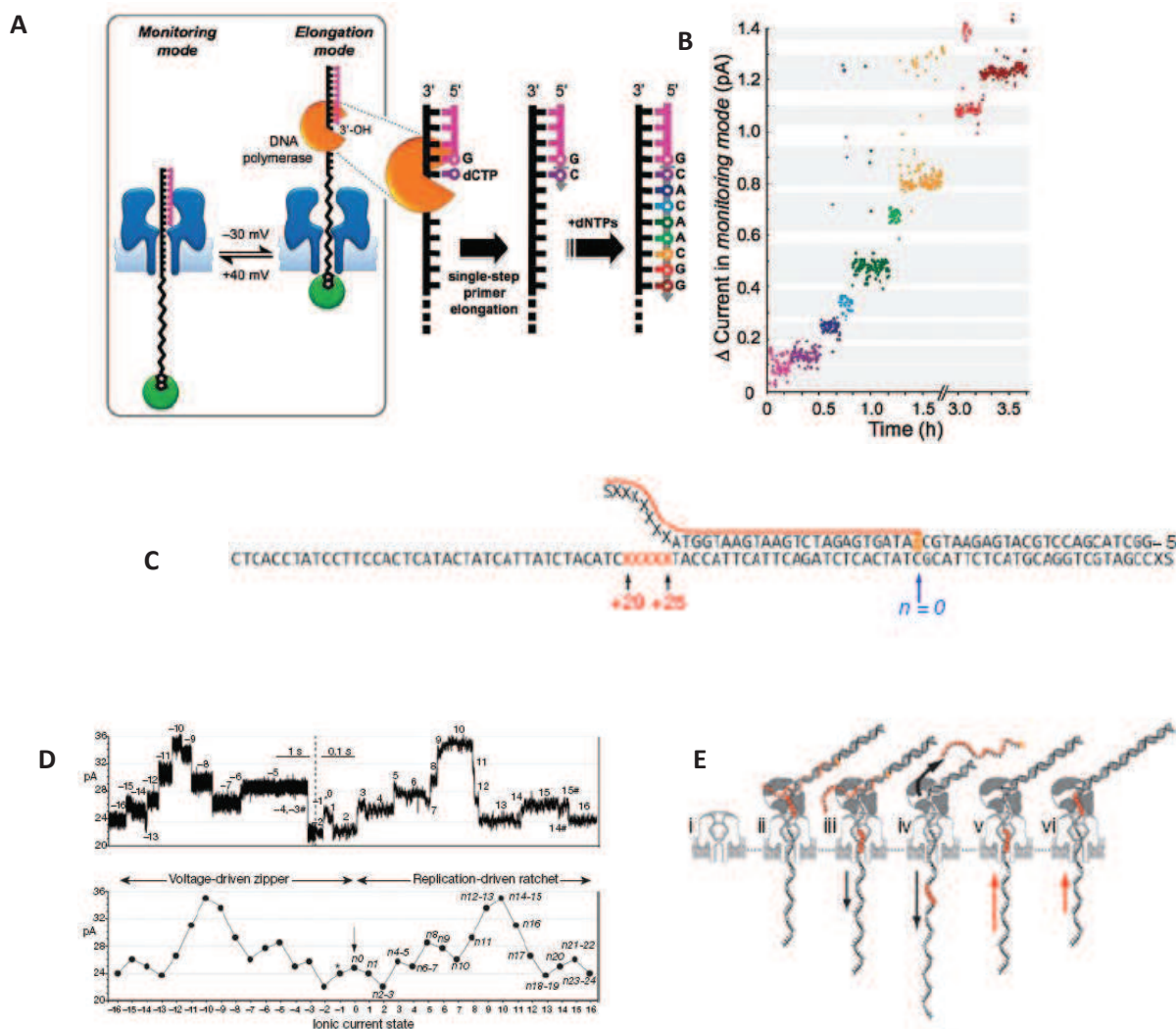


**Figure 49 :** (A) Schéma représentant un nanopore d'α-hémolysine avec un simple brin bloqué en son intérieur par un complexe biotine/streptavidine. (B), (C) et (D) Histogrammes des intensités de blocage de chaque nucléotide discriminé à l'intérieur du pore. [154]

Dans le cas de l'utilisation d'une épingle à cheveux, la translocation est seulement ralentie, le temps que celle-ci soit dégrafée sous l'action du champ électrique [176-179]. Plus la taille de l'épingle sera grande, plus elle nécessitera de force pour la défaire, entraînant des temps de translocation de plus en plus longs. Par exemple, une épingle avec une tige longue de 3 paires de bases va traverser le pore pendant des temps de l'ordre de la milliseconde tandis que si la tige est plus longue, 8 paires de bases par exemple, ce temps augmente jusqu'à la seconde [156]. Cette méthode a également permis à Nurit Ashkenasy *et al.* [157] de situer plus précisément le lieu de constriction du pore, influençant l'intensité de blocage, au niveau du 20<sup>e</sup> nucléotide après la tige et la boucle de l'épingle.

Une dernière solution plus récente est d'utiliser des polymérases pour faire avancer les molécules dans le pore avec des vitesses variant de 2,5 à 40 nucléotides par seconde [161]. Scott L. Cockcroft *et al.* [160] et Gerlad M. Cherf *et al.* [161] ont travaillé sur des expériences similaires concernant l'analyse de simples brins mécaniquement déplacés à travers un pore d'α-hémolysine par une polymérase.

Toutes ces molécules d'ADN possèdent une partie simple brin et une partie double brin. L'un des brins du double brin, appelé primer, est protégé de la polymérase par un oligomère bloquant (Cf. Figure 50, A). Ainsi rien ne se passe en solution tant que ce bloquant est présent. Le simple brin entre dans le pore mais est bloqué dès que la partie double brin se retrouve à l'entrée, moment auquel le dégrafage du bloquant se produit. Le primer ainsi libre, la polymérase va pouvoir s'y lier pour commencer la réplication de l'ADN présent dans le pore. A chaque base ajoutée, le courant de blocage évolue et peut ainsi être suivi en fonction de l'ajout de chaque nucléotide.



**Figure 50 :** (A) Schéma représentant un simple brin d'ADN dans un pore d'α-hémolysine sur lequel vient se placer une polymérase. L'histogramme en (B) correspond à l'intensité de blocage de la molécule bloquée dans le pore en fonction du temps, sur laquelle la polymérase opère la réplication[160]. (C) Exemple de séquence d'ADN utilisée. (D) Trace de courant caractéristique de ce type d'analyse utilisant une polymérase. (E) Représentation du déplacement des molécules en solution. [161]

### Analyse de doubles brins d'ADN et d'ARN à l'aide de nanopores synthétiques

Les premières expériences menées avec des pores biologiques ont permis de montrer l'intérêt et les avantages des analyses à l'aide de nanopores. Cependant, les doubles brins d'ADN (environ 2,2 nm de diamètre), sont trop larges pour traverser le canal transmembranaire de l'α-hémolysine (environ 1,5 nm) et ne peuvent donc pas être étudiés. Les nanopores solides, de diamètre contrôlé, ont permis la translocation des doubles brins d'ADN ou ARN. La comparaison des paramètres observés lors de la translocation d'une même molécule à travers des pores synthétiques de diamètres différents a permis aux groupes de Golovchenko [148] et Meller [149] de voir que la translocation de molécules d'ADN dépend des interactions avec le pore. Par exemple, Wanunu *et al.* [149] ont montré que dans un pore de 8 nm, une molécule d'ADN de 8000 paires de bases (bp) a un temps de translocation moyen inférieur à 0,1 ms tandis que dans un pore de 4 nm, cette même molécule traverse beaucoup plus lentement avec des temps centrés environ autour de 10 ms. Ce ralentissement est dû à une augmentation des interactions entre les molécules et l'intérieur

du pore. Cependant, la quantité d'événements correspondant aux attaques des molécules contre le pore, sans translocation, ne varie que légèrement. Un pore plus grand entraîne donc des distributions moins complexes et un rapport translocations/collisions plus important. Il est même possible d'observer des molécules d'ADN traversant le pore dans un état replié [148, 180]. Contrairement aux expériences menées sur des ADN simple brin dans l' $\alpha$ -hémolysine, le temps de translocation des ADN double brin n'augmente pas linéairement avec la longueur de la molécule mais selon une loi de puissance ( $\tau \propto L^{1,26}$ , avec L la longueur de la chaîne) [180]. Ceci est dû à la très grande longueur des chaînes utilisées et à l'importance des effets de volume exclu sur la conformation des chaînes à l'entrée du pore. Ces temps plus importants de translocation des brins d'ADN à travers un nanopore synthétique permettraient ainsi d'améliorer la détection de nucléotides, améliorant ainsi leur séquençage.

Des variations des taux de blocage par des ADN double ou simple brin en fonction du potentiel, sont également observées. Ces différences sont attribuées aux différentes longueurs de persistance de ces deux types de molécules. Pour un simple brin (un poly(A), un poly(C) ou un poly(U)), le taux de blocage décroît lorsque le potentiel appliqué augmente car ces molécules adoptent une structure en hélice ou en bobine en solution. Lorsque la tension appliquée est plus importante, les molécules sont plus étirées et occupent un volume moins important dans le pore, résultant en une diminution du courant de blocage. Pour les doubles brins, c'est le comportement opposé qui est observé. Le taux de blocage augmente avec le potentiel sûrement à cause d'une augmentation des interactions entre l'ADN et le pore à haut voltage [181]. De plus, les ADN/ARN simples brins et doubles brins entraînent des intensités de blocage très différentes. Le groupe de Cees Dekker a utilisé cette propriété pour étudier la translocation d'hybrides d'ADN [150] où la chaîne possède un côté simple brin et l'autre côté double brin. La partie double brin traverse le pore sous forme linéaire tandis que le simple brin se retrouve sous forme de pelote dans laquelle certaines parties du simple brin se sont hybridées (Figure 51, A). Lorsque la molécule traverse le pore, on observe deux niveaux de blocage du courant, l'un de faible amplitude correspondant à la partie double brin, et un deuxième de forte amplitude correspondant à la partie simple brin de la molécule (Figure 51, B). Dans 80% des cas observés, c'est la partie double brin qui entre en premier dans le pore, suivie par la partie simple brin, contre seulement 20% des cas dans l'autre sens, ce qui s'explique sûrement par le fait que la partie double brin possède un rayon hydrodynamique plus important, et donc une probabilité d'approche et d'entrée dans le pore plus importante que la partie simple brin.

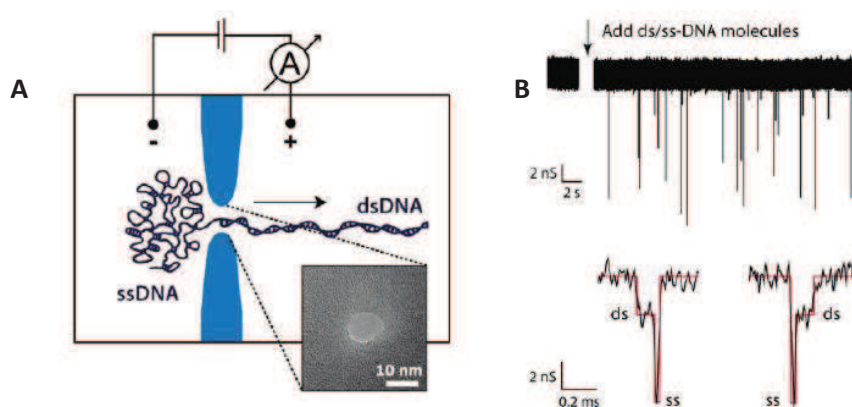


Figure 51 : (A) Schéma représentant la molécule hybride ADN double brin – ADN simple brin traversant un nanopore artificiel par son extrémité double brin. (B) Traces représentant la translocation de ces molécules hybrides. [150]

### 1.4.3.c. Séquençage de peptides et protéines

#### Séquençage de peptides

Les peptides peuvent également être analysés par nanopore de la même manière que le sont les acides nucléiques, cependant, beaucoup moins d'études y sont consacrées. Toutes ont pour but l'analyse des structures des peptides, ou mélanges de peptides, afin d'essayer de réaliser leur séquençage. Cependant, un polynucléotide est constitué d'un enchaînement de quatre différents monomères (chacun des 4 nucléotides) tandis que les peptides et protéines sont constitués d'un enchaînement de plus de vingt différents monomères (les 22 acides aminés). Les possibilités de séquençage des peptides et protéines sont donc beaucoup plus faibles et compliquées à mettre en œuvre.

Pour les analyses des peptides, le groupe de Jeremy S. Lee utilise de l' $\alpha$ -hémolysine wild-type mais il est également possible d'utiliser des mutants, comme le fait Liviu Movileanu [103], pour essayer d'améliorer la sensibilité de la technique. Todd C. Sutherland *et al.* [182] ont étudié des peptides de différentes tailles et ont vu qu'ils entraînent des réponses électriques différentes. Ils ont ainsi observé trois différents peptides, P1, P2 et P3, terminés par un ferrocène fc (pour créer un groupe  $fc^+$  par oxydation électrochimique et rendre les peptides chargés positivement) (Cf. Figure 52, A pour leur séquence) de différentes longueurs et ont montré que la durée de translocation de la molécule est proportionnelle à la longueur de la chaîne (408  $\mu s$  pour P1, 547  $\mu s$  pour P2 et 591  $\mu s$  pour P3) et que le volume de la chaîne influe sur le taux de blocage, tout comme cela a été montré pour les acides nucléiques. L'analyse de deux autres peptides leur a permis d'obtenir des informations supplémentaires. Le premier, similaire au peptide P3 mais pour lequel le composé ferrocène fc est oxydé en ferrocenium  $fc^+$ , attribuant ainsi une charge positive au peptide. Cette oxydation résulte en une augmentation du temps de translocation à travers le pore de la molécule (passant de 591 à 649  $\mu s$ ), positivement chargée, diffusant contre le champ appliqué. Le cinquième peptide analysé, CT7n, possède 37 acides aminés et, pourtant, traverse le pore en des temps comparables à ceux de P1, qui ne possède que 8 acides aminés. Cette observation leur a permis d'en déduire que les peptides peuvent également traverser le pore de façon repliée [182]. D'autres analyses ont également été menées sur des peptides en hélices  $\alpha$ , cationiques [183] ou anioniques [167], ou sur des peptides en  $\beta$ -hairpines [184], toujours dans le but d'accéder dans le futur à un séquençage de ces peptides.

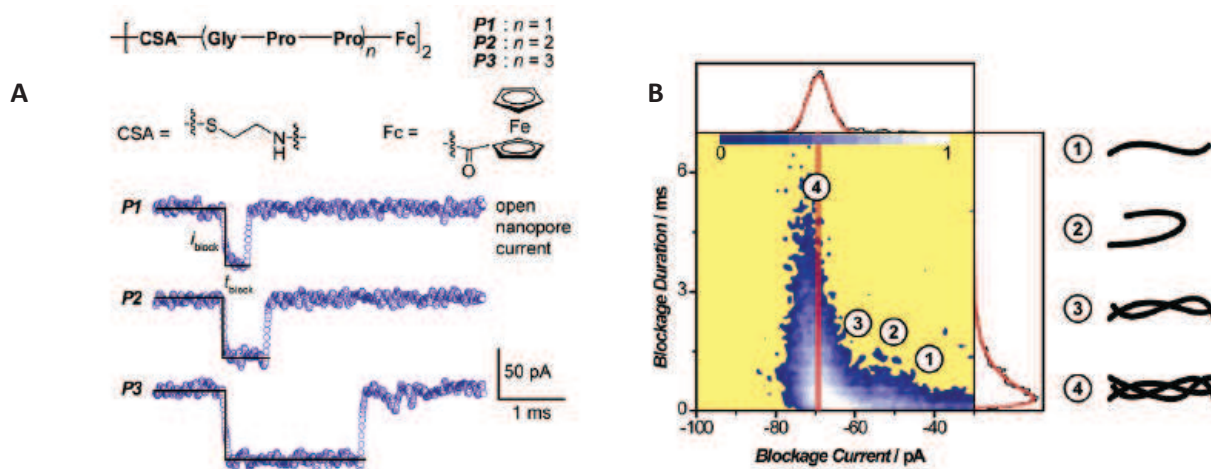


Figure 52 : (A) 3 peptides analysés ainsi que la trace de courant en résultant. (B) Nuage de points représentant le temps de blocage en fonction de l'intensité de blocage. [182]



La possibilité de modifier le pore d' $\alpha$ -hémolysine par mutagenèse a permis de nouvelles études plus précises des peptides. Liviu Movileanu et son équipe ont modifié un pore en deux emplacements distincts, remplaçant les lysines en positions 131 et 147 par des acides aspartiques [103, 185-187], ce qui a eu pour effet d'ajouter un « piège » à l'entrée du pore (modification en position 131), à la sortie du canal transmembranaire (modification en position 147) ou à ces deux endroits en même temps (Figure 33, A). Le pore qui était faiblement sélectif aux anions devient sélectif aux cations, ajoutant des sites de liaison attractifs pour les peptides positivement chargés, ce qui leur permet de traverser le pore plus rapidement qu'à travers le pore d' $\alpha$ -hémolysine wild-type. La présence seule du piège à l'entrée du pore permet d'augmenter la constante d'association et donc la fréquence des événements, tandis que la présence seule du piège en sortie du pore entraîne une augmentation de la constante de dissociation. L'association des deux modifications est cumulative et entraîne une augmentation des deux constantes d'association et de dissociation. L'équipe de Xiyun Guan [188] a quant à elle modifié la méthionine 113 par une phénylalanine ou une tyrosine, possédant toutes les deux des groupements aromatiques, ainsi que la lysine 147 par une asparagine et la thréonine 145 par une phénylalanine. Les peptides étant également majoritairement composés d'acides aminés aromatiques, de fortes affinités de liaison avec le pore apparaissent. Cette méthode leur a permis de discriminer un mélange de plusieurs peptides, d'après leurs intensités de blocage, dont certains se différençaient par un seul acide aminé (Figure 53, B et C).

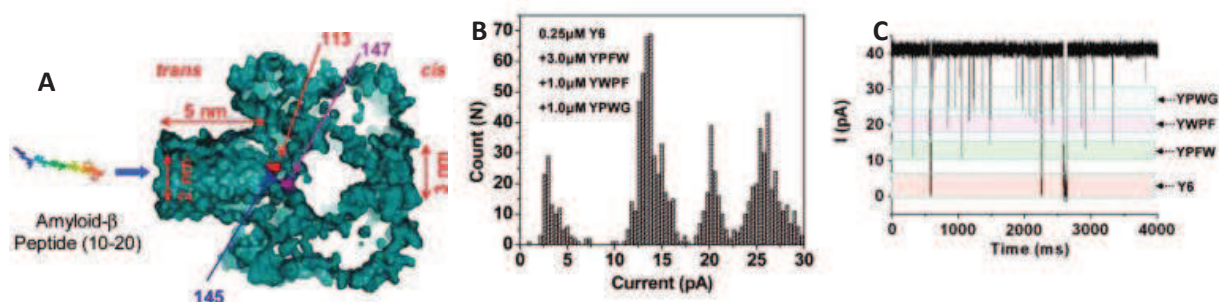


Figure 53 : (A) Représentation du pore d' $\alpha$ -hémolysine modifié en positions 113, 145 et 147. (B) Histogramme de courant discriminant les différents peptides en fonction de leur taux de blocage. (C) Trace du mélange de peptides. [188]

Contrairement aux acides nucléiques qui se différencient essentiellement par leur encombrement dans le pore, les peptides peuvent également être discriminés d'après leur hydrophobicité. Celle-ci a une forte influence sur la constante d'association, entraînant une diminution de cette dernière lorsque l'hydrophobicité du peptide augmente [103, 185, 186]. Ceci peut s'expliquer par la nature hydrophile de l'intérieur du pore d' $\alpha$ -hémolysine.

Plus récemment, Jeremy S. Lee et son équipe ont observé des événements correspondant à des événements d'intercalations [189, 190]. Ces événements correspondent aux molécules qui entrent dans le pore mais qui en ressortent sans le traverser. La difficulté d'observation de ces événements réside dans le fait qu'ils entraînent de larges blocages de courant, tout comme les translocations, compliquant davantage les tentatives de séquençage des peptides.

### Analyse des protéines entières

Outre les analyses à but de séquençage, il est possible d'étudier la structure des protéines ainsi que les interactions dans lesquelles elles interviennent. Sous leur forme native, les protéines sont trop grosses pour pouvoir traverser le pore d' $\alpha$ -hémolysine ou un autre pore protéique du même ordre de grandeur. L'essentiel de ces expériences est donc conduit dans des nanopores artificiels avec des diamètres variant de 3 à 100 nm selon les besoins. Mohammad *et al.* [191] ont étudié les interactions entre la protéine pb<sub>2</sub>-Ba (constituée de la région N-terminal du précytochrome b<sub>2</sub> fusionné avec la partie N-terminal d'une petite ribonucléase, la barnase) et un pore d' $\alpha$ -hémolysine modifié en positions 131 et 147 (ce pore est décrit plus précisément dans la partie I.4.2.b). En utilisant des séquences positivement chargées sur la partie pb<sub>2</sub>, les auteurs ont montré que les interactions protéine – pore dépendent de la longueur de la préséquence, en plus des autres paramètres comme la présence ou non de piège électrostatique dans le lumen du pore, la force ionique ou le potentiel transmembranaire. Ceci pourrait permettre d'améliorer les conditions d'analyses des protéines, en contrôlant leur translocation.

L'utilisation de nanopores artificiels de diamètre compris entre une et plusieurs dizaines de nanomètres, permet d'observer la translocation de protéines telles que la BSA (Bovine Serum Albumine) un fibrinogène [192] ou encore des complexes antigène – anticorps [193]. La surface interne du pore peut également être fonctionnalisée pour différentes raisons : cela permet d'attacher des agents de reconnaissance moléculaire (MRA) dans le pore [129, 194] comme une biotine ou une protéine G pour lier les protéines traversant le pore à leur MRA correspondant. Par exemple, la streptavidine va se lier à la biotine en traversant le pore ou encore, une immunoglobuline (IgG) va se lier à la protéine G se trouvant dans le pore. Cela peut également permettre de ralentir certaines protéines ciblées en ajoutant une bicouche lipidique sur la surface interne du pore [195]. En fonction des lipides utilisés, les temps de translocation diffèrent. Par exemple, la streptavidine a un temps de translocation d'environ 114  $\mu$ s avec une membrane lipidique de POPC (avec une chaîne monoinsaturée de 18 carbones et une seconde chaîne saturée de 16 carbones) alors que le temps de translocation avec une membrane de DAPPC (avec deux chaînes monoinsaturées de 16 carbones) diminue à 81  $\mu$ s environ. De plus, contrairement aux autres stratégies pour augmenter les temps de translocation, comme changer la viscosité ou augmenter la longueur du pore, cette méthode ne modifie pas la conductivité de l'électrolyte et donc ne diminue pas le rapport signal/bruit.

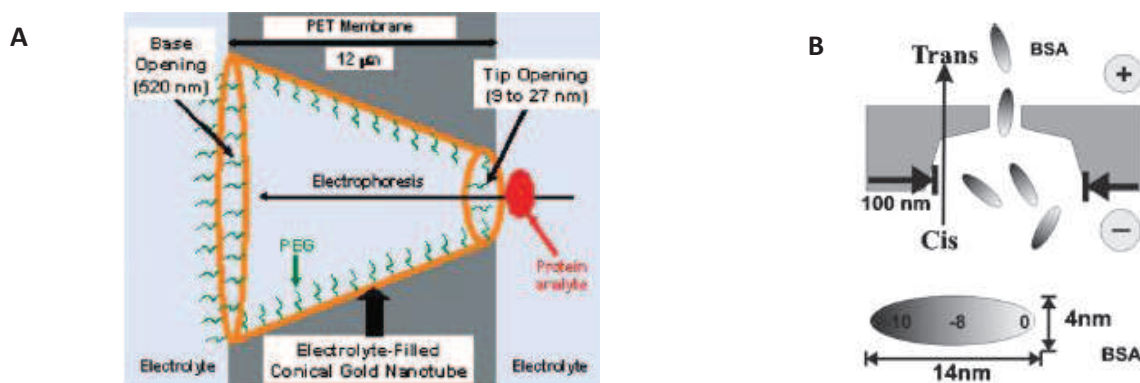


Figure 54 : (A) Exemple de nanotube conique dont les parois internes ont été fonctionnalisées par des molécules de PEG [194]. (B) Nanopore solide au travers duquel traversent des molécules de BSA [192].



Plusieurs équipes ont travaillé sur la BSA [192-194, 196, 197] et sur les effets du pH ou du diamètre du pore sur les événements qui lui sont associés. D'après Sexton *et al.* [194], il existe une tension seuil à partir de laquelle les protéines (BSA) peuvent traverser le nanotube. En dessous de cette tension, la force exercée n'est pas suffisamment élevée pour contrecarrer la barrière de potentiel. La valeur de cette tension seuil est plus élevée pour des pores de diamètres inférieurs car la BSA (de forme elliptique, d'environ 14 nm de long et 4 nm de large) perdrait des degrés de liberté rotationnelle. Cependant, la durée de translocation est indépendante du diamètre du pore. Les équipes de Jiali Li [192] et de Urs Staufer [193] ont aussi analysé la BSA ainsi que d'autres molécules, mais en étudiant également l'influence du pH. Le résultat observé est que lorsque le pH de la solution est trop éloigné du pI de la protéine à analyser, la translocation est trop rapide et ne peut donc pas être correctement analysée. Le pH de la solution doit donc se rapprocher du pI de la molécule, de façon à ralentir la molécule en diminuant son nombre de charge (et donc sa mobilité), ce qui entraîne des temps de translocation plus importants.

Des analyses ont ensuite été effectuées pour observer l'influence des interactions protéine – protéine comme les interactions antigène – anticorps. Lorsque les deux protéines (l'antigène et l'anticorps correspondant) sont présentes en solution, celles-ci se lient l'une à l'autre, formant un complexe de taille plus importante que celle des deux protéines seules. Par exemple, Sexton *et al.* [194] ont montré la BSA et l'anti-BSA-Fab se lient ensemble pour former un complexe. Indépendamment l'un de l'autre, leur temps de translocation sont d'environ 500 et 460 ms, respectivement. Par contre, lorsque les deux protéines se trouvent ensemble en solution, on obtient des temps de translocation d'environ 2200 ms, correspondant au complexe de ces deux protéines. Les nanopores peuvent ainsi être utilisés pour étudier la stœchiométrie de liaison entre un ligand et un récepteur.

### *Analyse du dépliement de protéines*

Un axe de développement des nanopores en tant que système d'analyse des protéines concerne la dénaturation des protéines. Le repliement des protéines est un processus biologique très important et mal compris jusqu'à présent. L'étude du dépliement des protéines par nanopore pourrait faire avancer la compréhension de ces processus et également permettre de trouver des traitements contre des processus pathologiques suite à un mauvais repliement comme la maladie d'Alzheimer par exemple.

La plupart des études dans le domaine ont été effectuées par le groupe de Loïc Auvray et Juan Pelta [166, 168, 198-201] avec la protéine maltose binding protein (MBP ou MalE) comme modèle. Les auteurs ont montré qu'il était possible de dénaturer la MalE à l'aide de chlorure de guanidium 1,44 M [201].

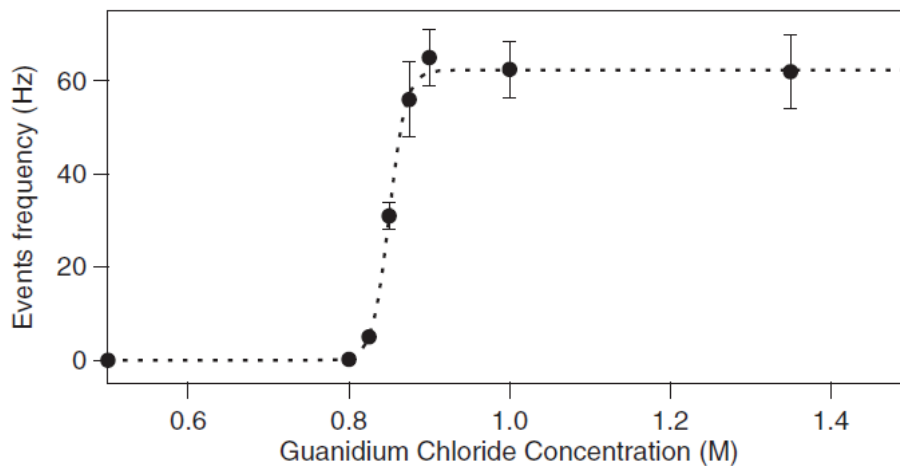


Figure 55 : Evolution de la fréquence de blocage en fonction de la concentration en chlorure de guanidium. [201]

L'évolution de la courbe des fréquences de blocage en fonction de la concentration en guanidium ressemble à une sigmoïde. Avant ajout de guanidium en solution, la MBP native est trop grosse et ne peut donc pas traverser le pore d' $\alpha$ -hémolysine. Des événements commencent à être observés lorsque la concentration en guanidium atteint 0,8 M. A partir de cette concentration, de longs blocages ainsi que des très courts apparaissent, correspondant à des segments de protéines non dépliés et aux protéines partiellement dépliées (Figure 56, A). La fréquence d'événements augmente ensuite rapidement avec la concentration en agent dénaturant pour finalement obtenir la dénaturation totale de la protéine à environ 1,5 M en guanidium. Les auteurs ont également analysé un mutant moins stable de la MBP, le MalE219, pour lequel ils ont observé que la sigmoïde est décalée vers des concentrations plus faibles en agent dénaturant [168]. Ces expériences ont également été menées sur des nanopores artificiels [198, 200] pour lesquels les événements correspondant à la protéine native sont également visibles, contrairement aux pores protéiques, du fait des interactions protéine – nanopore ainsi qu'au flux électro-osmotique [126]. La méthode utilisée de dénaturation des protéines est uniquement chimique (sous l'action d'agents dénaturants comme l'urée ou le guanidium).

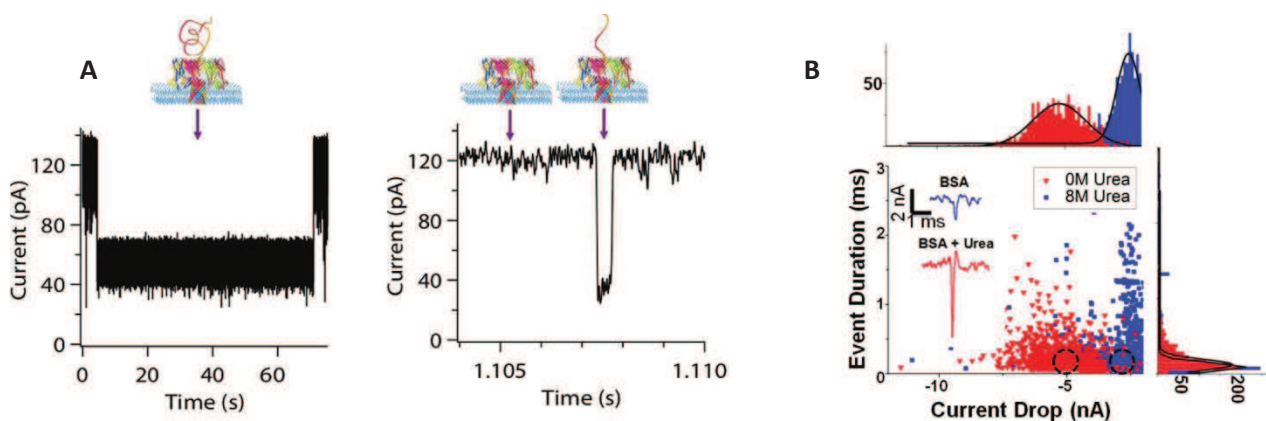


Figure 56 : (A) Exemple d'un événement causé par une protéine partiellement (à gauche) ou totalement (à droite) dépliée [168]. (B) Histogramme des intensités de blocage montrant la nette séparation entre les protéines dépliées (en bleu) et les protéines natives (en rouge), nuage de points et histogramme des durées de passage [202].

D'autres groupes ont également effectué des études du repliement des protéines comme Radu Stefureac et Jeremy S. Lee par dénaturation chimique (sous l'action d'un agent dénaturant) ou électrique (sous l'action de la force électrique) à travers des pores protéiques ( $\alpha$ -hémolysine et aérolysine) ou artificiels [203-205], et David S. Talaga et Jiali Li [206] avec dénaturation électrique dans des nanopores artificiels. L'équipe de Min Jun Kim a utilisé des nanopores artificiels pour leur étude concernant le dépliement des protéines mais ont réalisé cette dénaturation de trois différentes manières : chimique, électrique et thermique [202]. Les expériences de dénaturation chimique ont été effectuées avec des solutions de protéines contenant de l'urée 8M permettant ainsi d'observer les différences de signaux électriques causés par la translocation des protéines dépliées ou natives. On voit que les signaux résultant des interactions des protéines dépliées ou natives sont aisément différenciables d'après leur intensité de blocage mais sont totalement confondus si on regarde la distribution en durée d'événements (Figure 56, B). La différence des intensités de blocage provient du fait que les protéines dépliées deviennent moins compactes et plus de sites d'hydratations apparaissent, entraînant une augmentation de la taille effective de la protéine et donc une augmentation du courant de blocage (ou une diminution du courant résiduel) lorsque la protéine dénaturée traverse le pore. La dénaturation peut aussi être obtenue électriquement. En augmentant le potentiel appliqué, une force est engendrée sur les chaînes d'acides aminés causant une instabilité structurale pouvant aller jusqu'à la dénaturation de la protéine. Enfin, la dénaturation thermique dépend de la température ainsi que de la durée d'exposition à cette température. Elle peut être réversible mais elle commence à être irréversible pour des températures supérieures à 50°C. Dans ce cas, lorsque la température redescend jusqu'à la température ambiante, la protéine peut se replier partiellement mais sans récupérer sa conformation native. D'après les expériences, la conformation majoritaire en solution est celle repliée plutôt que la forme totalement dénaturée. Deux types d'événements sont détectés, les protéines repliées après dénaturation thermique, et les protéines toujours à l'état natif, n'ayant pas eu le temps d'être dépliées sous l'action de la température [207].

#### I.4.3.d. Interactions biomoléculaires

Les nanopores peuvent être utilisés pour effectuer des mesures de spectroscopie de force, à l'échelle de la molécule unique [176, 208-211]. Lorsque la molécule entrant dans le pore est un oligomère d'acides nucléiques, les forces appliquées sont similaires à celles des techniques plus habituelles de spectroscopie de forces (entre 0,1 et  $10^3$  pN). Différents types de liaisons peuvent ainsi être étudiées telles que les interactions ADN – ADN, les liaisons ADN – Protéine ou encore les interactions récepteur – ligand.

A un simple brin d'ADN est attaché une molécule de biotine est liée à une avidine sur l'extrémité 5' [208]. Une séquence connue de 14 nucléotides du côté 3' (la sonde) est insérée dans un pore d' $\alpha$ -hémolysine (ou un pore artificiel) en appliquant un potentiel de +200 mV (Figure 57, étape a). L'avidine, beaucoup plus grosse que le diamètre du pore, empêche la translocation complète du brin d'ADN à travers le pore, laissant l'extrémité 14-mer de l'autre côté du pore, dans le compartiment *trans*. Dans ce même compartiment, des oligonucléotides sont introduits, avec lesquels le 14-mer ayant traversé le pore va former un duplexe sonde-ADN (Figure 57, étape b) puis le potentiel est fortement réduit, permettant aux sondes n'ayant pas formé de complexe, de ressortir du pore (Figure 57, étape c). Le potentiel est ensuite inversé (-50 mV) entraînant la dissociation du complexe sonde-ADN (Figure 57, étapes d et e).

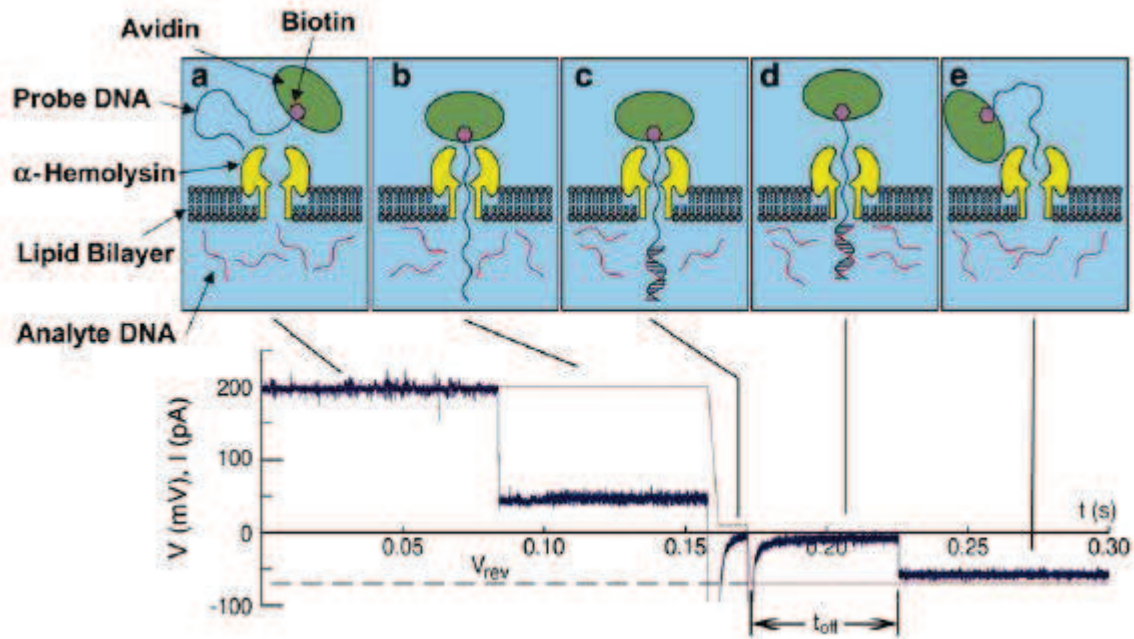


Figure 57 : Application des nanopores à la spectroscopie de force à l'échelle de la molécule unique. [208]

Les analytes sont différenciés en fonction du temps  $t_{off}$  que mettent les duplexes à se dissocier. Ce temps décroît exponentiellement avec le potentiel appliqué et est plus long pour les molécules parfaitement complémentaires de la sonde. Par exemple, à -40 mV, le temps de dissociation de l'analyte parfaitement complémentaire de la sonde est au moins 30 fois plus important que le temps de dissociation de n'importe quel autre analyte comportant un dépareillement [208]. La largeur de la barrière énergétique à franchir pour permettre à la sonde de s'échapper est aussi un paramètre permettant de discriminer les analytes. Elle est plus grande pour les analytes possédant une plus grande région de séquence complémentaire à la sonde (par exemple avec un dépareillement par rapport au complémentaire au niveau des extrémités 3' et 5') contrairement aux autres analytes avec un dépareillement en milieu de séquence, qui auront plutôt deux courtes régions de séquences complémentaires.

Ce système peut être réalisé avec un nanopore artificiel [211], beaucoup plus robuste que les membranes lipidiques, permettant ainsi l'application de potentiels plus importants (jusqu'à 900 mV), ou encore, avec un réseau de nanopores [208]. Des pinces optiques peuvent également être couplées aux expériences nanopores [212]. Ainsi, un colloïde sur lequel est attaché un brin d'ADN, est piégé optiquement par un laser. Le brin d'ADN peut donc être arrêté pendant sa translocation à travers le nanopore. La force agissant sur la molécule d'ADN éloigne le colloïde du centre du piège optique, permettant la mesure de la force appliquée sur la molécule d'ADN. L'équipe de Cees Dekker, à l'université de Delft, a trouvé que cette force augmente linéairement avec le potentiel appliqué, d'un facteur de 0,23 pN/mV [120] et que cette force est indépendante de la concentration saline (mesurée entre 20 mM et 1M). Ils ont également observé que plus le nanopore est petit, plus la force électrophorétique augmente [213]. Cette méthode de couplage de pinces optiques aux nanopores a depuis été réutilisée par plusieurs groupes pour analyses des brins d'ADN [214-216], des complexes ADN-protéine [217] ou des molécules d'ARN [218].

Cette technique, comparée aux techniques classiques de spectroscopie de force (AFM, pinces optiques ou magnétiques), permet d'obtenir un rapport signal/bruit élevé et une détection des oligonucléotides avec une résolution d'une unique base. Les analytes ne nécessitent pas de modifications préalables et il n'est pas non plus nécessaire d'introduire de molécule étrangère dans la cellule ciblée, ce qui permettrait d'appliquer cette technique sur la membrane d'une cellule vivante, testant les molécules présentes dans le cytoplasme.

#### I.4.3.e. Spectrométrie de masse par nanopore

En augmentant la concentration en sel, on écrante les interactions électrostatiques, ce qui permet de ralentir le passage des chaînes. En outre, la hausse résultante du courant ionique permet d'augmenter le niveau de résolution des courants de blocages, ce qui ouvre la possibilité d'effectuer un tri des molécules selon leur masse. Les chaînes neutres de poly(éthylène glycol) (PEG) coordinent les cations présents en solution. Il est ainsi possible de révéler les différentes populations existantes en solution dans le cas de PEG polydisperses [219, 220]. Les chaînes sont dans ce cas différenciées par leur courant de blocage, différent selon la taille de la molécule traversant le pore (Figure 58). L'histogramme du courant normalisé de blocage donne un spectre ressemblant fortement à un spectre de masse (Figure 59, A et B). La courbe bleue sur la Figure 59, A représente le courant de blocage normalisé caractéristique de molécules de PEG 1294 (n=29) monodisperse. A partir de là, les autres pics sur la courbe rouge ont pu être attribués aux différents degrés de polymérisation des molécules de PEG polydisperse.

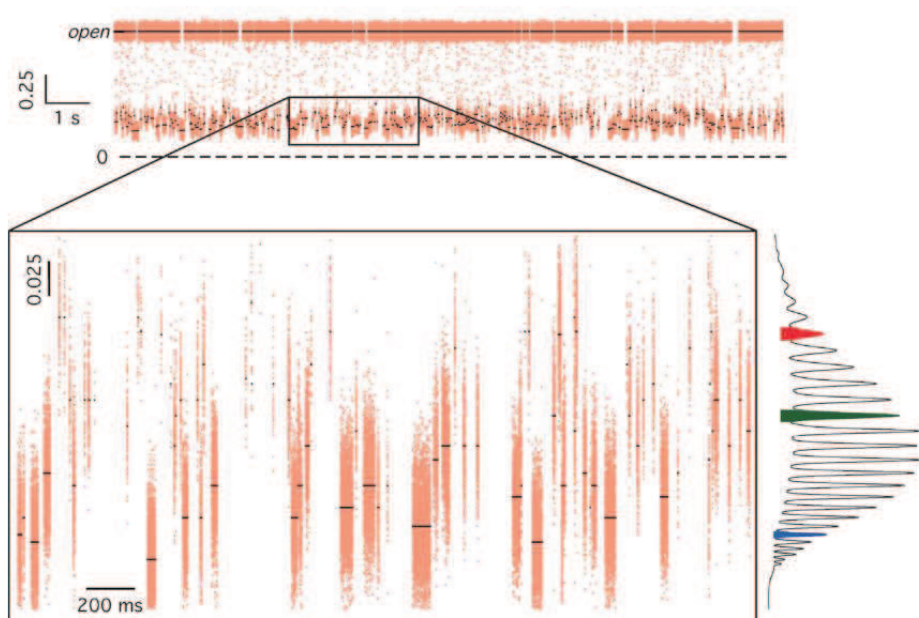
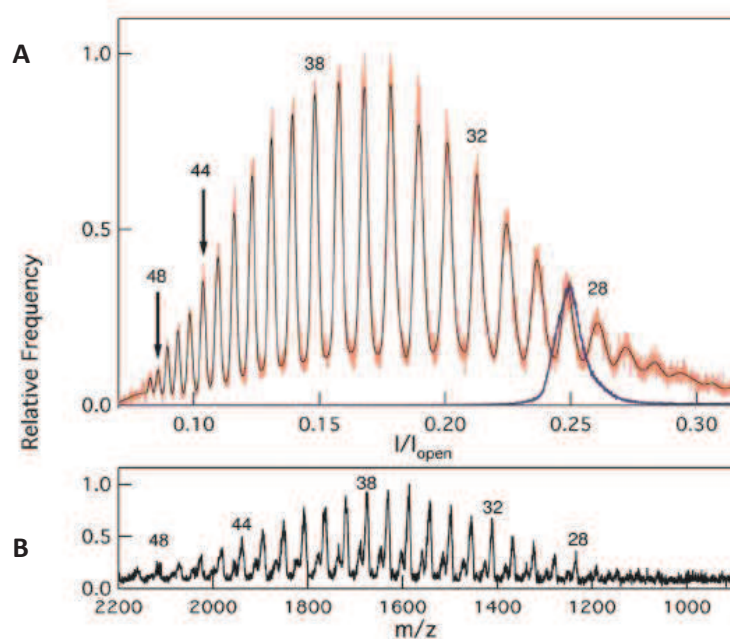


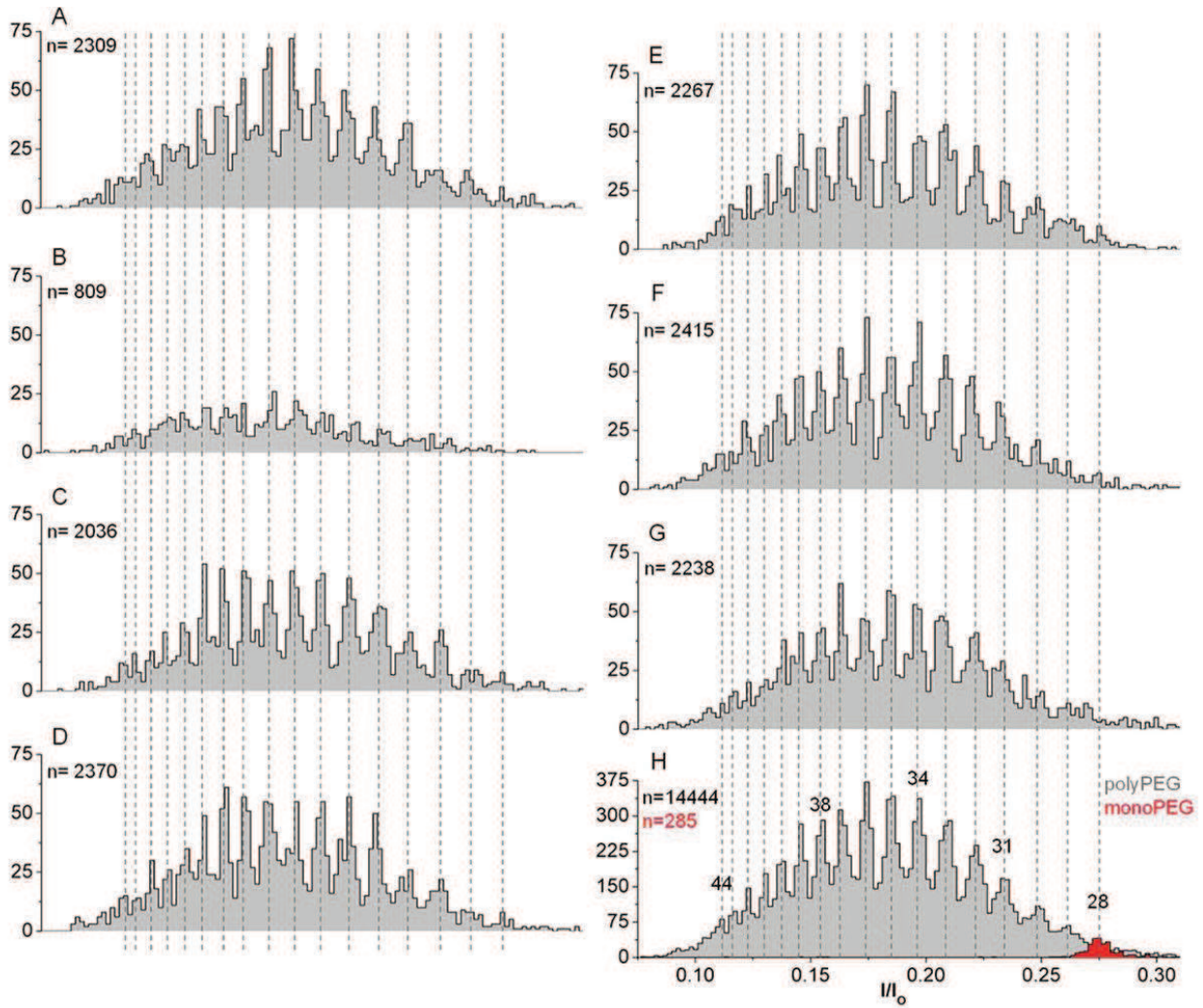
Figure 58 : Trace de courant montrant les différences de taux de blocage pour un mélange de PEG 1500 polydisperse. [219]



**Figure 59** : Application de la technique des nanopores à la spectrométrie de masse. (A) Spectre de masse obtenu par nanopore avec en rouge la distribution d'une solution de PEG polydisperse et en bleu une solution de PEG monodisperse. (B) Spectre de masse classique obtenu par MALDI-TOF. [219]

Cette étude a également été réalisée par Gerhard Baaken *et al.* [221], utilisant un réseau permettant jusqu'à la présence de 16 nanopores individuels, en parallèle.





**Figure 60 :** (A à G) Histogrammes des intensités normalisées de blocage obtenus pour des molécules de PEG polydisperse, pour plusieurs pores individuels d' $\alpha$ -HL, en parallèle. (H) Histogramme combiné des sept expériences individuelles A à H, auquel est superposé l'histogramme des intensités normalisées de blocage pour des molécules de PEG 28 monodisperse, en rouge. [221]

Les avantages de cette analyse en parallèle sont l'augmentation des informations obtenues ainsi que la réduction du temps nécessaire pour obtenir suffisamment de données. Pour l'instant, ces réseaux permettent l'enregistrement simultané de données de plusieurs pores unitaires sous les mêmes conditions expérimentales, mais la perspective, citée par les auteurs, d'obtenir plusieurs pores unitaires sous des conditions différentes est très attractive.

## I.5. Nanopores et polysaccharides

### I.5.1. Etat de l'art

Jusqu'à présent, les nanopores ont très largement été utilisés en tant qu'outils de détection de peptides et protéines, d'acides nucléiques ainsi que de polymères neutres. Cependant, la famille des polysaccharides a été étudiée relativement peu à travers des canaux ioniques. Seules quelques études s'y sont penchées et la majorité d'entre elles n'utilisent les polysaccharides qu'en tant que polyélectrolytes, afin d'étudier et d'analyser le comportement des nanopores protéiques utilisées. C'est le cas par exemple de l'équipe de Loïc Auvray à l'Université d'Evry qui étudie et compare le transport de molécules de dextrane sulfate à travers l' $\alpha$ -hémolysine avec le transport de protéines à travers ce même pore [199, 222, 223]. Luciana R. Texeira *et al.*, en 2009 [224], ont également étudié les interactions de molécules de dextrane sulfate avec le pore d' $\alpha$ -hémolysine mais les ont comparées avec les interactions dues à des molécules d'héparine et le même pore. Les différences pour cette étude sont qu'ils travaillent majoritairement avec des pores multiples (bien qu'ils aient fait quelques expériences avec des pores unitaires) et qu'ils cherchent à estimer la vitesse à laquelle les molécules (de différents degrés de polymérisation) d'héparine et de dextrane sulfate réussissent à bloquer les canaux ioniques.

Toutes ces études utilisent donc des polysaccharides mais uniquement en tant que polyélectrolytes, afin de découvrir ou de vérifier des caractéristiques propres au canal ionique étudié. Seul un article, dont les expériences ont été menées au laboratoire LAMBE à l'Université d'Evry, propose d'utiliser les nanopores en tant que « détecteurs » de conformation, pour remonter jusqu'à la structure des polysaccharides étudiés [225]. Les molécules utilisées sont des oligosaccharides de maltose et de dextrane, des molécules neutres. La discrimination de ces deux types de molécules se fait en fonction de la liaison glycosidique ainsi qu'en fonction du degré de polymérisation.

Une autre équipe, celle de Mathias Winterhalter, s'est penchée sur les polysaccharides, des oligosaccharides du maltose, mais cette fois le pore utilisé était la maltoporine [226, 227], une protéine trimérique qui permet de faciliter la diffusion des maltodextrines à travers les membranes externes des bactéries Gram négatif. Leurs expériences leur ont permis de définir plusieurs paramètres de la maltoporine, comme l'asymétrie du pore, le fait qu'un oligosaccharide de maltose bloque l'un des monomères du trimère ou encore que les molécules entrent et se lient plus facilement à la maltoporine lorsqu'elles rentrent par un côté plutôt que par l'autre. Ce même groupe a également utilisé les maltodextrines, ainsi que des bactériophages  $\lambda$  afin d'étudier dans quel sens s'insère majoritairement la maltoporine dans la cellule [228]. Ils ont ainsi observé que l'insertion de la maltoporine est unidirectionnelle, avec les boucles extracellulaires du canal s'orientant face au côté *trans* de la membrane (dans le cas de leurs expériences). Le compartiment *cis* correspondant quant à lui à la partie interne de la membrane bactérienne. Des expériences peuvent ainsi être reproduites, dans les conditions physiologiques.

## **I.6. Conclusion**

Pour conclure cet état de l'art, nous avons vu que les polysaccharides sont très difficiles à caractériser, de par leur large variété structurale. C'est pourquoi la méthode d'analyse basée sur le transport de molécules à travers un nanopore devrait permettre une amélioration de leur caractérisation. En analysant les polysaccharides à l'échelle de la molécule unique, il devrait être possible de discerner des molécules de structures similaires mais dont la conformation est différente. Les différentes populations présentes au sein d'un mélange hétérogène devraient également pouvoir être discernées.

L'utilisation des nanopores n'a que très rarement été appliquée à l'étude des polysaccharides. C'est pourquoi nous proposons d'effectuer cette étude.

## I.7. Références bibliographiques

1. *Structure Amylose, Amylopectine, Cellulose* <http://membres.multimania.fr/jjvw/4342.htm>.
2. McEver, R., Moore, K., and Cummings, R., *Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(19): p. 11025-11028.
3. Gorin, P.A.J. and Spencer, J.F.T., *Structural Chemistry of Fungal Polysaccharides*, in *Advances in Carbohydrate Chemistry*, L.W. Melville and R.S. Tipson, Editors. 1968, Academic Press. p. 367-417.
4. Abu-Lail, N.I. and Camesano, T.A., *Polysaccharide properties probed with atomic force microscopy*. J Microsc, 2003. **212**(Pt 3): p. 217-38.
5. Minamisawa, T. and Hirabayashi, J., *Acquisition of Structural Information on Glycosaminoglycans by Using Mass Spectrometry*. Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2006. **18**(103): p. 293-312.
6. Pomin, V.H., Sharp, J.S., Li, X., Wang, L., and Prestegard, J.H., *Characterization of Glycosaminoglycans by <sup>15</sup>N NMR Spectroscopy and in Vivo Isotopic Labeling*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(10): p. 4078-4088.
7. Zaia, J., *Glycosaminoglycan glycomics using mass spectrometry*. Mol Cell Proteomics, 2013.
8. Williams, M.A.K., Marshall, A., Haverkamp, R.G., and Draget, K.I., *Stretching single polysaccharide molecules using AFM: A potential method for the investigation of the intermolecular uronate distribution of alginate?* Food Hydrocolloids, 2008. **22**(1): p. 18-23.
9. Jackson, R.L., Busch, S.J., and Cardin, A.D., *Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes*. Physiol Rev, 1991. **71**(2): p. 481-539.
10. Gama, C.I. and Hsieh-Wilson, L.C., *Chemical approaches to deciphering the glycosaminoglycan code*. Curr Opin Chem Biol, 2005. **9**(6): p. 609-19.
11. Vogel, K., Kuhn, J., Kleesiek, K., and Gotting, C., *A novel ultra-sensitive method for the quantification of glycosaminoglycan disaccharides using an automated DNA sequencer*. Electrophoresis, 2006. **27**(7): p. 1363-7.
12. Flangea, C., Schiopu, C., Sisu, E., Serb, A., Przybylski, M., Seidler, D.G., and Zamfir, A.D., *Determination of sulfation pattern in brain glycosaminoglycans by chip-based electrospray ionization ion trap mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 2009. **395**(8): p. 2489-98.
13. Wu, J., Deng, X., Zhang, Y., Wang, L., Tian, B.-q., and Xie, B.-j., *Application of Atomic Force Microscopy in the Study of Polysaccharide*. Agricultural Sciences in China, 2009. **8**(12): p. 1458-1465.
14. Clerte, C., Declerck, N., and Margeat, E., *Competitive folding of anti-terminator/ terminator hairpins monitored by single molecule FRET*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(4): p. 2632-43.
15. Zorrilla, S., Lillo, M.P., Chaix, D., Margeat, E., Royer, C.A., and Declerck, N., *Investigating transcriptional regulation by fluorescence spectroscopy, from traditional methods to state-of-the-art single-molecule approaches*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1130**: p. 44-51.
16. Olofsson, L. and Margeat, E., *Pulsed interleaved excitation fluorescence spectroscopy with a supercontinuum source*. Opt Express, 2013. **21**(3): p. 3370-8.
17. Ashkin, A., Dziedzic, J.M., Bjorkholm, J.E., and Chu, S., *Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*. Opt Lett, 1986. **11**(5): p. 288.
18. Block, S.M., Goldstein, L.S., and Schnapp, B.J., *Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers*. Nature, 1990. **348**(6299): p. 348-52.
19. Svoboda, K. and Block, S.M., *Biological applications of optical forces*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1994. **23**: p. 247-85.
20. Svoboda, K., Schmidt, C.F., Schnapp, B.J., and Block, S.M., *Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry*. Nature, 1993. **365**(6448): p. 721-7.
21. Yin, H., Wang, M.D., Svoboda, K., Landick, R., Block, S.M., and Gelles, J., *Transcription against an applied force*. Science, 1995. **270**(5242): p. 1653-7.
22. Svoboda, K., Schmidt, C.F., Branton, D., and Block, S.M., *Conformation and elasticity of the isolated red blood cell membrane skeleton*. Biophys J, 1992. **63**(3): p. 784-93.
23. Kurachi, M., Hoshi, M., and Tashiro, H., *Buckling of a single microtubule by optical trapping forces: direct measurement of microtubule rigidity*. Cell Motil Cytoskeleton, 1995. **30**(3): p. 221-8.



24. Tsuda, Y., Yasutake, H., Ishijima, A., and Yanagida, T., *Torsional rigidity of single actin filaments and actin-actin bond breaking force under torsion measured directly by in vitro micromanipulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 12937-42.
25. Smith, S.B., Cui, Y., and Bustamante, C., *Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules*. Science, 1996. **271**(5250): p. 795-9.
26. Schéma de fonctionnement des pinces optiques  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Optical\\_Trap\\_As\\_a\\_Spring.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Optical_Trap_As_a_Spring.jpg).
27. Neuman, K.C. and Nagy, A., *Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy*. Nat Meth, 2008. **5**(6): p. 491-505.
28. Strick, T.R., Allemand, J.F., Bensimon, D., and Croquette, V., *Behavior of Supercoiled DNA*. Biophysical Journal, 1998. **74**(4): p. 2016-2028.
29. Strick, T.R., Allemand, J.F., Bensimon, D., Bensimon, A., and Croquette, V., *The elasticity of a single supercoiled DNA molecule*. Science, 1996. **271**(5257): p. 1835-7.
30. Charvin, G., Strick, T.R., Bensimon, D., and Croquette, V., *Tracking topoisomerase activity at the single-molecule level*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2005. **34**: p. 201-19.
31. Charvin, G., Bensimon, D., and Croquette, V., *Single-molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(17): p. 9820-5.
32. Strick, T.R., Croquette, V., and Bensimon, D., *Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase*. Nature, 2000. **404**(6780): p. 901-4.
33. Dekker, N.H., Rybenkov, V.V., Duguet, M., Crisona, N.J., Cozzarelli, N.R., Bensimon, D., and Croquette, V., *The mechanism of type IA topoisomerases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12126-31.
34. Revyakin, A., Ebright, R.H., and Strick, T.R., *Single-molecule DNA nanomanipulation: improved resolution through use of shorter DNA fragments*. Nat Methods, 2005. **2**(2): p. 127-38.
35. Binnig, G., Quate, C.F., and Gerber, C., *Atomic Force Microscope*. Physical Review Letters, 1986. **56**(9): p. 930-933.
36. Keller, D. and Bustamante, C., *Attaching molecules to surfaces for scanning probe microscopy*. Biophys J, 1993. **64**(3): p. 896-7.
37. Fellah, A., Belmiloud, N., Haverkamp, R.G., Hemar, Y., Otter, D., and Williams, M.A.K., *Facilitating high-force single-polysaccharide stretching using covalent attachment of one end of the chain*. Carbohydrate Polymers, 2012. **87**(1): p. 806-815.
38. Fellah, A., Anjukandi, P., Hemar, Y., Otter, D., and Williams, M.A.K., *Towards polysaccharide handles for single molecule experiments: Spectroscopic evidence for the selective covalent coupling of terminal sugar residues to desired substrates*. Carbohydrate Polymers, 2011. **86**(1): p. 105-111.
39. Rief, M., Oesterhelt, F., Heymann, B., and Gaub, H.E., *Single Molecule Force Spectroscopy on Polysaccharides by Atomic Force Microscopy*. Science, 1997. **275**(5304): p. 1295-7.
40. Grandbois, M., Beyer, M., Rief, M., Clausen-Schaumann, H., and Gaub, H.E., *How strong is a covalent bond?* Science, 1999. **283**(5408): p. 1727-30.
41. Fernandez, J.M. and Li, H., *Force-clamp spectroscopy monitors the folding trajectory of a single protein*. Science, 2004. **303**(5664): p. 1674-8.
42. Lee, G.U., Chrisey, L.A., and Colton, R.J., *Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA*. Science, 1994. **266**(5186): p. 771-3.
43. Wiita, A.P., Perez-Jimenez, R., Walther, K.A., Grater, F., Berne, B.J., Holmgren, A., Sanchez-Ruiz, J.M., and Fernandez, J.M., *Probing the chemistry of thioredoxin catalysis with force*. Nature, 2007. **450**(7166): p. 124-7.
44. Coulter, W.H., *Means for counting particles suspended in a fluid*. 1953, Coulter, Wallace H.: United States.
45. Exemple de nanopore artificiel : <http://labs.mcb.harvard.edu/branton/projects-NanoporeSequencing.htm>.
46. Exemple de nanopore protéique : <http://www.washington.edu/news/archive/id/59886>.
47. Neher, E. and Sakmann, B., *Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres*. Nature, 1976. **260**(5554): p. 799-802.

48. Korchev, Y.E., Bashford, C.L., Alder, G.M., Kasianowicz, J.J., and Pasternak, C.A., *Low conductance states of a single ion channel are not 'closed'*. Journal of Membrane Biology, 1995. **147**(3): p. 233-239.
49. Krasilnikov, O.V., Sabirov, R.Z., Ternovsky, V.I., Merzliak, P.G., and Muratkhodjaev, J.N., *A simple method for the determination of the pore radius of ion channels in planar lipid bilayer membranes*. FEMS Microbiology Letters, 1992. **105**(1-3): p. 93-100.
50. Kasianowicz, J.J., Brandin, E., Branton, D., and Deamer, D.W., *Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 13770-13773.
51. Lyubchenko, Y., Shlyakhtenko, L., Harrington, R., Oden, P., and Lindsay, S., *Atomic force microscopy of long DNA: imaging in air and under water*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993. **90**(6): p. 2137-2140.
52. Cluzel, P., Lebrun, A., Heller, C., Lavery, R., Viovy, J.L., Chatenay, D., and Caron, F., *DNA: an extensible molecule*. Science, 1996. **271**(5250): p. 792-4.
53. Carrion-Vazquez, M., Marszalek, P.E., Oberhauser, A.F., and Fernandez, J.M., *Atomic force microscopy captures length phenotypes in single proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11288-92.
54. Rief, M., Gautel, M., Oesterhelt, F., Fernandez, J.M., and Gaub, H.E., *Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM*. Science, 1997. **276**(5315): p. 1109-12.
55. Finer, J.T., Simmons, R.M., and Spudich, J.A., *Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps*. Nature, 1994. **368**(6467): p. 113-9.
56. Cowman, M.K., Li, M., and Balazs, E.A., *Tapping Mode Atomic Force Microscopy of Hyaluronan: Extended and Intramolecularly Interacting Chains*. Biophysical Journal, 1998. **75**(4): p. 2030-2037.
57. Sletmoen, M., Maurstad, G., Sikorski, P., Paulsen, B.S., and Stokke, B.T., *Characterisation of bacterial polysaccharides: steps towards single-molecular studies*. Carbohydrate Research, 2003. **338**(23): p. 2459-2475.
58. Marszalek, P.E., Li, H., and Fernandez, J.M., *Fingerprinting polysaccharides with single-molecule atomic force microscopy*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(3): p. 258-62.
59. Fisher, T.E., Marszalek, P.E., and Fernandez, J.M., *Stretching single molecules into novel conformations using the atomic force microscope*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(9): p. 719-24.
60. Round, A.N., Rigby, N.M., MacDougall, A.J., Ring, S.G., and Morris, V.J., *Investigating the nature of branching in pectin by atomic force microscopy and carbohydrate analysis*. Carbohydr Res, 2001. **331**(3): p. 337-42.
61. Kirby, A.R., Gunning, A.P., Morris, V.J., and Ridout, M.J., *Observation of the helical structure of the bacterial polysaccharide acetan by atomic force microscopy*. Biophys J, 1995. **68**(1): p. 360-3.
62. Pastre, D., Joshi, V., Curmi, P.A., and Hamon, L., *Detection of Single DNA Molecule Hybridization on a Surface by Atomic Force Microscopy*. Small, 2013.
63. Florin, E.L., Moy, V.T., and Gaub, H.E., *Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs*. Science, 1994. **264**(5157): p. 415-7.
64. Moy, V., Florin, E., and Gaub, H., *Intermolecular forces and energies between ligands and receptors*. Science, 1994. **266**(5183): p. 257-259.
65. Ludwig, M., Rief, M., Schmidt, L., Li, H., Oesterhelt, F., Gautel, M., and Gaub, H.E., *AFM, a tool for single-molecule experiments*. Applied Physics A, 1999. **68**(2): p. 173-176.
66. Marszalek, P.E., Oberhauser, A.F., Pang, Y.P., and Fernandez, J.M., *Polysaccharide elasticity governed by chair-boat transitions of the glucopyranose ring*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 661-4.
67. Fisher, T.E., Marszalek, P.E., Oberhauser, A.F., Carrion-Vazquez, M., and Fernandez, J.M., *The micro-mechanics of single molecules studied with atomic force microscopy*. J Physiol, 1999. **520 Pt 1**: p. 5-14.
68. Zhang, Q., Lee, G., and Marszalek, P.E., *Atomic cranks and levers control sugar ring conformations*. Journal of Physics: Condensed Matter, 2005. **17**(18): p. S1427.
69. Marszalek, P.E., Pang, Y.P., Li, H., El Yazal, J., Oberhauser, A.F., and Fernandez, J.M., *Atomic levers control pyranose ring conformations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 7894-8.
70. *Conformations cycle uronique* : <http://webpda.ac-montpellier.fr/wspc/ABCDORGA/Famille/CONF CYCLOHEXANE.html>.



71. Haverkamp, R.G., Marshall, A.T., and Williams, M.A.K., *Model for stretching elastic biopolymers which exhibit conformational transformations*. Physical Review E, 2007. **75**(2): p. 021907.
72. Li, H., Rief, M., Oesterhelt, F., Gaub, H.E., Zhang, X., and Shen, J., *Single-molecule force spectroscopy on polysaccharides by AFM – nanomechanical fingerprint of  $\alpha$ -(1,4)-linked polysaccharides*. Chemical Physics Letters, 1999. **305**(3–4): p. 197-201.
73. Li, H., Rief, M., Oesterhelt, F., and Gaub, H.E., *Single-Molecule Force Spectroscopy on Xanthan by AFM*. Advanced Materials, 1998. **10**(4): p. 316-319.
74. Marszalek, P.E., Li, H., Oberhauser, A.F., and Fernandez, J.M., *Chair-boat transitions in single polysaccharide molecules observed with force-ramp AFM*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(7): p. 4278-83.
75. Marszalek, P.E., Oberhauser, A.F., Li, H., and Fernandez, J.M., *The Force-Driven Conformations of Heparin Studied with Single Molecule Force Microscopy*. Biophysical Journal, 2003. **85**(4): p. 2696-2704.
76. Garcia-Ochoa, F., Santos, V., Casas, J., and Gomez, E., *Xanthan gum: production, recovery, and properties*. Biotechnology advances, 2000. **18**(7): p. 549-579.
77. Haverkamp, R.G., Williams, M.A.K., and Scott, J.E., *Stretching Single Molecules of Connective Tissue Glycans to Characterize Their Shape-Maintaining Elasticity*. Biomacromolecules, 2005. **6**(3): p. 1816-1818.
78. Zhang, Q. and Marszalek, P.E., *Identification of Sugar Isomers by Single-Molecule Force Spectroscopy*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(17): p. 5596-5597.
79. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R., *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1977. **74**(12): p. 5463-5467.
80. Maxam, A.M. and Gilbert, W., *A new method for sequencing DNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1977. **74**(2): p. 560-564.
81. Deamer, D.W. and Akeson, M., *Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing*. Trends in Biotechnology, 2000. **18**(4): p. 147-151.
82. Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-51.
83. Shendure, J., Mitra, R.D., Varma, C., and Church, G.M., *Advanced sequencing technologies: methods and goals*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(5): p. 335-44.
84. Clarke, J., Wu, H.C., Jayasinghe, L., Patel, A., Reid, S., and Bayley, H., *Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing*. Nat Nanotechnol, 2009. **4**(4): p. 265-70.
85. Stoddart, D., Heron, A.J., Mikhailova, E., Maglia, G., and Bayley, H., *Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a biological nanopore*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(19): p. 7702-7.
86. DeBlois, R.W. and Wesley, R.K., *Sizes and concentrations of several type C oncornaviruses and bacteriophage T2 by the resistive-pulse technique*. J Virol, 1977. **23**(2): p. 227-33.
87. Song, L., Hobaugh, M.R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H., and Gouaux, J.E., *Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore*. Science, 1996. **274**(5294): p. 1859-66.
88. Parker, M.W., Van Der Goot, F.G., and Buckley, J.T., *Aerolysin — the ins and outs of a model channel-forming toxin*. Molecular Microbiology, 1996. **19**(2): p. 205-212.
89. Tilley, S.J. and Saibil, H.R., *The mechanism of pore formation by bacterial toxins*. Current Opinion in Structural Biology, 2006. **16**(2): p. 230-236.
90. Menestrina, G., Dalla Serra, M., and Prévost, G., *Mode of action of  $\beta$ -barrel pore-forming toxins of the staphylococcal  $\alpha$ -hemolysin family*. Toxicon, 2001. **39**(11): p. 1661-1672.
91. Insertion Hémolysine :  
<http://academics.wellesley.edu/Chemistry/Chem101/antibiotics/hemolysin%20insertion.gif>.
92. Gouaux, E.,  *$\alpha$ -Hemolysin from Staphylococcus aureus: An Archetype of  $\beta$ -Barrel, Channel-Forming Toxins*. Journal of Structural Biology, 1998. **121**(2): p. 110-122.
93. J.Thomas, B., *Crossing three membranes Channel formation by aerolysin*. FEBS Letters, 1992. **307**(1): p. 30-33.

94. Abrami, L., Fivaz, M., Decroly, E., Seidah, N.G., Jean, F., Thomas, G., Leppla, S.H., Buckley, J.T., and van der Goot, F.G., *The Pore-forming Toxin Proaerolysin Is Activated by Furin*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(49): p. 32656-32661.
95. van der Goot, F.G., Ausio, J., Wong, K.R., Pattus, F., and Buckley, J.T., *Dimerization stabilizes the pore-forming toxin aerolysin in solution*. The Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(24): p. 18272-18279.
96. Abrami, L., Fivaz, M., and van der Goot, F.G., *Adventures of a pore-forming toxin at the target cell surface*. Trends in Microbiology, 2000. **8**(4): p. 168-172.
97. Moniatte, M., van der Goot, F.G., Buckley, J.T., Pattus, F., and van Dorsselaer, A., *Characterisation of the heptameric pore-forming complex of the Aeromonas toxin aerolysin using MALDI-TOF mass spectrometry*. FEBS Letters, 1996. **384**(3): p. 269-272.
98. Cabiaux, V., Buckley, J.T., Wattiez, R., Ruyschaert, J.-M., Parker, M.W., and van der Goot, F.G., *Conformational Changes in Aerolysin during the Transition from the Water-Soluble Protoxin to the Membrane Channel* Biochemistry, 1997. **36**(49): p. 15224-15232.
99. Lesieur, C., Frutiger, S., Hughes, G., Kellner, R., Pattus, F., and van der Goot, F.G., *Increased Stability upon Heptamerization of the Pore-forming Toxin Aerolysin*. The Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(51): p. 36722-36728.
100. Parker, M.W., Buckley, J.T., Postma, J.P.M., Tucker, A.D., Leonard, K., Pattus, F., and Tsernoglou, D., *Structure of the Aeromonas toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states*. Nature, 1994. **367**(6460): p. 292-295.
101. Parker, M.W. and Feil, S.C., *Pore-forming protein toxins: from structure to function*. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 2005. **88**(1): p. 91-142.
102. Gu, L.Q., Cheley, S., and Bayley, H., *Capture of a single molecule in a nanocavity*. Science, 2001. **291**(5504): p. 636-40.
103. Wolfe, A.J., Mohammad, Cheley, S., Bayley, H., and Movileanu, L., *Catalyzing the Translocation of Polypeptides through Attractive Interactions*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(45): p. 14034-14041.
104. Rincon-Restrepo, M., Mikhailova, E., Bayley, H., and Maglia, G., *Controlled Translocation of Individual DNA Molecules through Protein Nanopores with Engineered Molecular Brakes*. Nano Letters, 2011. **11**(2): p. 746-750.
105. Bayley, H., *Designed membrane channels and pores*. Current Opinion in Biotechnology, 1999. **10**(1): p. 94-103.
106. Braha, O., Walker, B., Cheley, S., Kasianowicz, J.J., Song, L., Gouaux, J.E., and Bayley, H., *Designed protein pores as components for biosensors*. Chem Biol, 1997. **4**(7): p. 497-505.
107. Manrao, E.A., Derrington, I.M., Laszlo, A.H., Langford, K.W., Hopper, M.K., Gillgren, N., Pavlenok, M., Niederweis, M., and Gundlach, J.H., *Reading DNA at single-nucleotide resolution with a mutant MspA nanopore and phi29 DNA polymerase*. Nat Biotech, 2012. **30**(4): p. 349-353.
108. Cheley, S., Gu, L.-Q., and Bayley, H., *Stochastic Sensing of Nanomolar Inositol 1,4,5-Trisphosphate with an Engineered Pore*. Chemistry & Biology, 2002. **9**(7): p. 829-838.
109. Bayley, H. and Cremer, P.S., *Stochastic sensors inspired by biology*. Nature, 2001. **413**(6852): p. 226-230.
110. Howorka, S., Movileanu, L., Lu, X., Magnon, M., Cheley, S., Braha, O., and Bayley, H., *A Protein Pore with a Single Polymer Chain Tethered within the Lumen*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(11): p. 2411-2416.
111. Maglia, G., Restrepo, M.R., Mikhailova, E., and Bayley, H., *Enhanced translocation of single DNA molecules through alpha-hemolysin nanopores by manipulation of internal charge*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(50): p. 19720-5.
112. Howorka, S., Movileanu, L., Braha, O., and Bayley, H., *Kinetics of duplex formation for individual DNA strands within a single protein nanopore*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(23): p. 12996-3001.
113. Howorka, S., Cheley, S., and Bayley, H., *Sequence-specific detection of individual DNA strands using engineered nanopores*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(7): p. 636-9.

114. Gu, L.Q. and Bayley, H., *Interaction of the noncovalent molecular adapter, beta-cyclodextrin, with the staphylococcal alpha-hemolysin pore*. Biophys J, 2000. **79**(4): p. 1967-75.
115. Gu, L.Q., Cheley, S., and Bayley, H., *Prolonged residence time of a noncovalent molecular adapter, beta-cyclodextrin, within the lumen of mutant alpha-hemolysin pores*. J Gen Physiol, 2001. **118**(5): p. 481-94.
116. Gu, L.Q., Braha, O., Conlan, S., Cheley, S., and Bayley, H., *Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter*. Nature, 1999. **398**(6729): p. 686-90.
117. Astier, Y., Braha, O., and Bayley, H., *Toward Single Molecule DNA Sequencing: Direct Identification of Ribonucleoside and Deoxyribonucleoside 5'-Monophosphates by Using an Engineered Protein Nanopore Equipped with a Molecular Adapter*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(5): p. 1705-1710.
118. Sanchez-Quesada, J., Ghadiri, M.R., Bayley, H., and Braha, O., *Cyclic Peptides as Molecular Adapters for a Pore-Forming Protein*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(48): p. 11757-11766.
119. Nishizawa, M., Menon, V.P., and Martin, C.R., *Metal nanotubule membranes with electrochemically switchable ion-transport selectivity*. Science, 1995. **268**(5211): p. 700-2.
120. Dekker, C., *Solid-state nanopores*. Nat Nano, 2007. **2**(4): p. 209-215.
121. Gyurcsányi, R.E., *Chemically-modified nanopores for sensing*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2008. **27**(7): p. 627-639.
122. Li, J., Stein, D., McMullan, C., Branton, D., Aziz, M.J., and Golovchenko, J.A., *Ion-beam sculpting at nanometre length scales*. Nature, 2001. **412**(6843): p. 166-9.
123. Storm, A.J., Chen, J.H., Ling, X.S., Zandbergen, H.W., and Dekker, C., *Fabrication of solid-state nanopores with single-nanometre precision*. Nat Mater, 2003. **2**(8): p. 537-40.
124. Wu, M.-Y., Smeets, R.M.M., Zandbergen, M., Ziese, U., Krapf, D., Batson, P.E., Dekker, N.H., Dekker, C., and Zandbergen, H.W., *Control of Shape and Material Composition of Solid-State Nanopores*. Nano Letters, 2008. **9**(1): p. 479-484.
125. Fologea, D., Gershow, M., Ledden, B., McNabb, D.S., Golovchenko, J.A., and Li, J., *Detecting Single Stranded DNA with a Solid State Nanopore*. Nano Letters, 2005. **5**(10): p. 1905-1909.
126. Firnkes, M., Pedone, D., Knezevic, J., Döblinger, M., and Rant, U., *Electrically Facilitated Translocations of Proteins through Silicon Nitride Nanopores: Conjoint and Competitive Action of Diffusion, Electrophoresis, and Electroosmosis*. Nano Letters, 2010. **10**(6): p. 2162-2167.
127. Garaj, S., Hubbard, W., Reina, A., Kong, J., Branton, D., and Golovchenko, J.A., *Graphene as a subnanometre trans-electrode membrane*. Nature, 2010. **467**(7312): p. 190-3.
128. Schneider, G.g.F., Kowalczyk, S.W., Calado, V.E., Pandraud, G.g., Zandbergen, H.W., Vandersypen, L.M.K., and Dekker, C., *DNA Translocation through Graphene Nanopores*. Nano Letters, 2010. **10**(8): p. 3163-3167.
129. Siwy, Z., Trofin, L., Kohli, P., Baker, L.A., Trautmann, C., and Martin, C.R., *Protein biosensors based on biofunctionalized conical gold nanotubes*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(14): p. 5000-1.
130. Wanunu, M. and Meller, A., *Chemically modified solid-state nanopores*. Nano Lett, 2007. **7**(6): p. 1580-5.
131. Bezrukov, S.M., Vodyanoy, I., Brutyan, R.A., and Kasianowicz, J.J., *Dynamics and Free Energy of Polymers Partitioning into a Nanoscale Pore*. Macromolecules, 1996. **29**(26): p. 8517-8522.
132. Bezrukov, S.M. and Kasianowicz, J.J., *The charge state of an ion channel controls neutral polymer entry into its pore*. Eur Biophys J, 1997. **26**(6): p. 471-6.
133. Bezrukov, S.M., Vodyanoy, I., and Parsegian, V.A., *Counting polymers moving through a single ion channel*. Nature, 1994. **370**(6487): p. 279-281.
134. Rostovtseva, T.K., Nestorovich, E.M., and Bezrukov, S.M., *Partitioning of differently sized poly(ethylene glycol)s into OmpF porin*. Biophys J, 2002. **82**(1 Pt 1): p. 160-9.
135. Merzlyak, P.G., Yuldasheva, L.N., Rodrigues, C.G., Carneiro, C.M., Krasilnikov, O.V., and Bezrukov, S.M., *Polymeric nonelectrolytes to probe pore geometry: application to the alpha-toxin transmembrane channel*. Biophys J, 1999. **77**(6): p. 3023-33.
136. Movileanu, L., Cheley, S., Howorka, S., Braha, O., and Bayley, H., *Location of a constriction in the lumen of a transmembrane pore by targeted covalent attachment of polymer molecules*. J Gen Physiol, 2001. **117**(3): p. 239-52.



137. Movileanu, L. and Bayley, H., *Partitioning of a polymer into a nanoscopic protein pore obeys a simple scaling law*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10137-41.
138. Rodrigues, C.G., Machado, D.C., Chevtchenko, S.F., and Krasilnikov, O.V., *Mechanism of KCl Enhancement in Detection of Nonionic Polymers by Nanopore Sensors*. Biophysical Journal, 2008. **95**(11): p. 5186-5192.
139. Movileanu, L., Cheley, S., and Bayley, H., *Partitioning of individual flexible polymers into a nanoscopic protein pore*. Biophys J, 2003. **85**(2): p. 897-910.
140. Breton, M.F., Discala, F., Bacri, L., Foster, D., Pelta, J., and Oukhaled, A., *Exploration of Neutral Versus Polyelectrolyte Behavior of Poly(ethylene glycol)s in Alkali Ion Solutions using Single-Nanopore Recording*. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2013. **4**(13): p. 2202-2208.
141. Oukhaled, A.G., Biance, A.L., Pelta, J., Auvray, L., and Bacri, L., *Transport of long neutral polymers in the semidilute regime through a protein nanopore*. Phys Rev Lett, 2012. **108**(8): p. 088104.
142. Mathe, J., Aksimentiev, A., Nelson, D.R., Schulten, K., and Meller, A., *Orientation discrimination of single-stranded DNA inside the alpha-hemolysin membrane channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(35): p. 12377-82.
143. Meller, A., Nivon, L., Brandin, E., Golovchenko, J., and Branton, D., *Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(3): p. 1079-84.
144. Purnell, R.F., Mehta, K.K., and Schmidt, J.J., *Nucleotide Identification and Orientation Discrimination of DNA Homopolymers Immobilized in a Protein Nanopore*. Nano Letters, 2008. **8**(9): p. 3029-3034.
145. Butler, T.Z., Gundlach, J.H., and Troll, M.A., *Determination of RNA orientation during translocation through a biological nanopore*. Biophys J, 2006. **90**(1): p. 190-9.
146. Akeson, M., Branton, D., Kasianowicz, J.J., Brandin, E., and Deamer, D.W., *Microsecond time-scale discrimination among polycytidylic acid, polyadenylic acid, and polyuridylic acid as homopolymers or as segments within single RNA molecules*. Biophys J, 1999. **77**(6): p. 3227-33.
147. Vercoutere, W.A., Winters-Hilt, S., DeGuzman, V.S., Deamer, D., Ridino, S.E., Rodgers, J.T., Olsen, H.E., Marziali, A., and Akeson, M., *Discrimination among individual Watson-Crick base pairs at the termini of single DNA hairpin molecules*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(4): p. 1311-8.
148. Li, J., Gershow, M., Stein, D., Brandin, E., and Golovchenko, J.A., *DNA molecules and configurations in a solid-state nanopore microscope*. Nat Mater, 2003. **2**(9): p. 611-5.
149. Wanunu, M., Sutin, J., McNally, B., Chow, A., and Meller, A., *DNA translocation governed by interactions with solid-state nanopores*. Biophys J, 2008. **95**(10): p. 4716-25.
150. Kowalczyk, S.W., Tuijtel, M.W., Donkers, S.P., and Dekker, C., *Unraveling single-stranded DNA in a solid-state nanopore*. Nano Lett, 2010. **10**(4): p. 1414-20.
151. Steinbock, L.J., Otto, O., Chimere, C., Gornall, J., and Keyser, U.F., *Detecting DNA Folding with Nanocapillaries*. Nano Letters, 2010. **10**(7): p. 2493-2497.
152. Smeets, R.M.M., Keyser, U.F., Krapf, D., Wu, M.-Y., Dekker, N.H., and Dekker, C., *Salt Dependence of Ion Transport and DNA Translocation through Solid-State Nanopores*. Nano Letters, 2005. **6**(1): p. 89-95.
153. Wallace, E.V.B., Stoddart, D., Heron, A.J., Mikhailova, E., Maglia, G., Donohoe, T.J., and Bayley, H., *Identification of epigenetic DNA modifications with a protein nanopore*. Chemical Communications, 2010. **46**(43): p. 8195-8197.
154. Stoddart, D., Maglia, G., Mikhailova, E., Heron, A.J., and Bayley, H., *Multiple Base-Recognition Sites in a Biological Nanopore: Two Heads are Better than One*. Angewandte Chemie International Edition, 2010. **49**(3): p. 556-559.
155. Stoddart, D., Heron, A.J., Klingelhoefer, J., Mikhailova, E., Maglia, G., and Bayley, H., *Nucleobase Recognition in ssDNA at the Central Constriction of the  $\alpha$ -Hemolysin Pore*. Nano Letters, 2010. **10**(9): p. 3633-3637.
156. Vercoutere, W., Winters-Hilt, S., Olsen, H., Deamer, D., Haussler, D., and Akeson, M., *Rapid discrimination among individual DNA hairpin molecules at single-nucleotide resolution using an ion channel*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(3): p. 248-52.

157. Ashkenasy, N., Sanchez-Quesada, J., Bayley, H., and Ghadiri, M.R., *Recognizing a single base in an individual DNA strand: a step toward DNA sequencing in nanopores*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005. **44**(9): p. 1401-4.
158. Lieberman, K.R., Cherf, G.M., Doody, M.J., Olasagasti, F., Kolodji, Y., and Akeson, M., *Processive Replication of Single DNA Molecules in a Nanopore Catalyzed by phi29 DNA Polymerase*. *Journal of the American Chemical Society*, 2010. **132**(50): p. 17961-17972.
159. Benner, S., Chen, R.J., Wilson, N.A., Abu-Shumays, R., Hurt, N., Lieberman, K.R., Deamer, D.W., Dunbar, W.B., and Akeson, M., *Sequence-specific detection of individual DNA polymerase complexes in real time using a nanopore*. *Nat Nanotechnol*, 2007. **2**(11): p. 718-24.
160. Cockroft, S.L., Chu, J., Amorin, M., and Ghadiri, M.R., *A Single-Molecule Nanopore Device Detects DNA Polymerase Activity with Single-Nucleotide Resolution*. *Journal of the American Chemical Society*, 2008. **130**(3): p. 818-820.
161. Cherf, G.M., Lieberman, K.R., Rashid, H., Lam, C.E., Karplus, K., and Akeson, M., *Automated forward and reverse ratcheting of DNA in a nanopore at 5-A precision*. *Nat Biotech*, 2012. **30**(4): p. 344-348.
162. Mitchell, N. and Howorka, S., *Chemical tags facilitate the sensing of individual DNA strands with nanopores*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008. **47**(30): p. 5565-8.
163. Derrington, I.M., Butler, T.Z., Collins, M.D., Manrao, E., Pavlenok, M., Niederweis, M., and Gundlach, J.H., *Nanopore DNA sequencing with MspA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(37): p. 16060-5.
164. Manrao, E.A., Derrington, I.M., Pavlenok, M., Niederweis, M., and Gundlach, J.H., *Nucleotide discrimination with DNA immobilized in the MspA nanopore*. *PLoS One*, 2011. **6**(10): p. e25723.
165. Butler, T.Z., Pavlenok, M., Derrington, I.M., Niederweis, M., and Gundlach, J.H., *Single-molecule DNA detection with an engineered MspA protein nanopore*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(52): p. 20647-52.
166. Pastoriza-Gallego, M., Rabah, L., Gibrat, G., Thiebot, B., van der Goot, F.G., Auvray, L., Betton, J.-M., and Pelta, J., *Dynamics of Unfolded Protein Transport through an Aerolysin Pore*. *Journal of the American Chemical Society*, 2011. **133**(9): p. 2923-2931.
167. Stefureac, R., Long, Y.-t., Kraatz, H.-B., Howard, P., and Lee, J.S., *Transport of Alpha-Helical Peptides through Alpha-Hemolysin and Aerolysin Pores*. *Biochemistry*, 2006. **45**(30): p. 9172-9179.
168. Merstorf, C., Cressiot, B., Pastoriza-Gallego, M., Oukhaled, A., Betton, J.M., Auvray, L., and Pelta, J., *Wild type, mutant protein unfolding and phase transition detected by single-nanopore recording*. *ACS Chem Biol*, 2012. **7**(4): p. 652-8.
169. Fologea, D., Uplinger, J., Thomas, B., McNabb, D.S., and Li, J., *Slowing DNA Translocation in a Solid-State Nanopore*. *Nano Letters*, 2005. **5**(9): p. 1734-1737.
170. Kawano, R., Schibel, A.E.P., Cauley, C., and White, H.S., *Controlling the Translocation of Single-Stranded DNA through Alpha-Hemolysin Ion Channels Using Viscosity*. *Langmuir*, 2008. **25**(2): p. 1233-1237.
171. Meller, A., Nivon, L., and Branton, D., *Voltage-Driven DNA Translocations through a Nanopore*. *Physical Review Letters*, 2001. **86**(15): p. 3435-3438.
172. Meller, A. and Branton, D., *Single molecule measurements of DNA transport through a nanopore*. *Electrophoresis*, 2002. **23**(16): p. 2583-91.
173. Hurt, N., Wang, H., Akeson, M., and Lieberman, K.R., *Specific Nucleotide Binding and Rebinding to Individual DNA Polymerase Complexes Captured on a Nanopore*. *Journal of the American Chemical Society*, 2009. **131**(10): p. 3772-3778.
174. Winters-Hilt, S., Vercoutere, W., DeGuzman, V.S., Deamer, D., Akeson, M., and Haussler, D., *Highly accurate classification of Watson-Crick basepairs on termini of single DNA molecules*. *Biophys J*, 2003. **84**(2 Pt 1): p. 967-76.
175. Soni, G.V. and Meller, A., *Progress toward ultrafast DNA sequencing using solid-state nanopores*. *Clin Chem*, 2007. **53**(11): p. 1996-2001.
176. Dudko, O.K., Mathe, J., Szabo, A., Meller, A., and Hummer, G., *Extracting kinetics from single-molecule force spectroscopy: nanopore unzipping of DNA hairpins*. *Biophys J*, 2007. **92**(12): p. 4188-95.

177. Mathe, J., Visram, H., Viasnoff, V., Rabin, Y., and Meller, A., *Nanopore unzipping of individual DNA hairpin molecules*. Biophys J, 2004. **87**(5): p. 3205-12.
178. Sauer-Budge, A.F., Nyamwanda, J.A., Lubensky, D.K., and Branton, D., *Unzipping Kinetics of Double-Stranded DNA in a Nanopore*. Physical Review Letters, 2003. **90**(23): p. 238101.
179. McNally, B., Wanunu, M., and Meller, A., *Electromechanical Unzipping of Individual DNA Molecules Using Synthetic Sub-2 nm Pores*. Nano Letters, 2008. **8**(10): p. 3418-3422.
180. Storm, A.J., Storm, C., Chen, J., Zandbergen, H., Joanny, J.F., and Dekker, C., *Fast DNA translocation through a solid-state nanopore*. Nano Lett, 2005. **5**(7): p. 1193-7.
181. Skinner, G.M., van den Hout, M., Broekmans, O., Dekker, C., and Dekker, N.H., *Distinguishing Single- and Double-Stranded Nucleic Acid Molecules Using Solid-State Nanopores*. Nano Letters, 2009. **9**(8): p. 2953-2960.
182. Sutherland, T.C., Long, Y.-T., Stefureac, R.-I., Bediako-Amoa, I., Kraatz, H.-B., and Lee, J.S., *Structure of Peptides Investigated by Nanopore Analysis*. Nano Letters, 2004. **4**(7): p. 1273-1277.
183. Movileanu, L., Schmittschmitt, J.P., Martin Scholtz, J., and Bayley, H., *Interactions of Peptides with a Protein Pore*. Biophysical Journal, 2005. **89**(2): p. 1030-1045.
184. Goodrich, C.P., Kirmizialtin, S., Huyghues-Despointes, B.M., Zhu, A., Scholtz, J.M., Makarov, D.E., and Movileanu, L., *Single-Molecule Electrophoresis of  $\beta$ -Hairpin Peptides by Electrical Recordings and Langevin Dynamics Simulations*. The Journal of Physical Chemistry B, 2007. **111**(13): p. 3332-3335.
185. Mohammad, M. and Movileanu, L., *Excursion of a single polypeptide into a protein pore: simple physics, but complicated biology*. European Biophysics Journal, 2008. **37**(6): p. 913-925.
186. Bikwemu, R., Wolfe, A.J., Xing, X., and Movileanu, L., *Facilitated translocation of polypeptides through a single nanopore*. J Phys Condens Matter, 2010. **22**(45): p. 454117.
187. Movileanu, L., *Squeezing a single polypeptide through a nanopore*. Soft Matter, 2008. **4**(5): p. 925-931.
188. Zhao, Q., Jayawardhana, D.A., Wang, D., and Guan, X., *Study of Peptide Transport through Engineered Protein Channels*. The Journal of Physical Chemistry B, 2009. **113**(11): p. 3572-3578.
189. Christensen, C., Baran, C., Krasniqi, B., Stefureac, R.I., Nokhrin, S., and Lee, J.S., *Effect of charge, topology and orientation of the electric field on the interaction of peptides with the  $\alpha$ -hemolysin pore*. Journal of Peptide Science, 2011. **17**(11): p. 726-734.
190. Meng, H., Detillieux, D., Baran, C., Krasniqi, B., Christensen, C., Madampage, C., Stefureac, R.I., and Lee, J.S., *Nanopore analysis of tethered peptides*. Journal of Peptide Science, 2010. **16**(12): p. 701-708.
191. Mohammad, Prakash, S., Matouschek, A., and Movileanu, L., *Controlling a Single Protein in a Nanopore through Electrostatic Traps*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(12): p. 4081-4088.
192. Fologea, D., Ledden, B., McNabb, D.S., and Li, J., *Electrical characterization of protein molecules by a solid-state nanopore*. Appl Phys Lett, 2007. **91**(5): p. 539011-539013.
193. Han, A., Creus, M., Schürmann, G., Linder, V., Ward, T.R., de Rooij, N.F., and Staufer, U., *Label-Free Detection of Single Protein Molecules and Protein-Protein Interactions Using Synthetic Nanopores*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(12): p. 4651-4658.
194. Sexton, L.T., Horne, L.P., Sherrill, S.A., Bishop, G.W., Baker, L.A., and Martin, C.R., *Resistive-Pulse Studies of Proteins and Protein/Antibody Complexes Using a Conical Nanotube Sensor*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(43): p. 13144-13152.
195. Yusko, E.C., Johnson, J.M., Majd, S., Prangkio, P., Rollings, R.C., Li, J., Yang, J., and Mayer, M., *Controlling protein translocation through nanopores with bio-inspired fluid walls*. Nat Nano, 2011. **6**(4): p. 253-260.
196. Niedzwiecki, D.J., Grazul, J., and Movileanu, L., *Single-Molecule Observation of Protein Adsorption onto an Inorganic Surface*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(31): p. 10816-10822.
197. Han, A., Schurmann, G., Mondin, G., Bitterli, R.A., Hegelbach, N.G., de Rooij, N.F., and Staufer, U., *Sensing protein molecules using nanofabricated pores*. Applied Physics Letters, 2006. **88**(9): p. 093901-3.



198. Oukhaled, A., Cressiot, B., Bacri, L., Pastoriza-Gallego, M., Betton, J.-M., Bourhis, E., Jede, R., Gierak, J., Auvray, L., and Pelta, J., *Dynamics of Completely Unfolded and Native Proteins through Solid-State Nanopores as a Function of Electric Driving Force*. ACS Nano, 2011. **5**(5): p. 3628-3638.
199. Pastoriza-Gallego, M., Gibrat, G., Thiebot, B., Betton, J.-M., and Pelta, J., *Polyelectrolyte and unfolded protein pore entrance depends on the pore geometry*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2009. **1788**(6): p. 1377-1386.
200. Cressiot, B., Oukhaled, A., Patriarche, G., Pastoriza-Gallego, M., Betton, J.M., Auvray, L., Muthukumar, M., Bacri, L., and Pelta, J., *Protein Transport through a Narrow Solid-State Nanopore at High Voltage: Experiments and Theory*. ACS Nano, 2012. **6**(7): p. 6236-43.
201. Oukhaled, G., Mathé, J., Biance, A.L., Bacri, L., Betton, J.M., Lairez, D., Pelta, J., and Auvray, L., *Unfolding of Proteins and Long Transient Conformations Detected by Single Nanopore Recording*. Physical Review Letters, 2007. **98**(15): p. 158101.
202. Freedman, K.J., Jurgens, M., Prabhu, A., Ahn, C.W., Jemth, P., Edel, J.B., and Kim, M.J., *Chemical, thermal, and electric field induced unfolding of single protein molecules studied using nanopores*. Anal Chem, 2011. **83**(13): p. 5137-44.
203. Stefureac, R.I., Trivedi, D., Marziali, A., and Lee, J.S., *Evidence that small proteins translocate through silicon nitride pores in a folded conformation*. J Phys Condens Matter, 2010. **22**(45): p. 454133.
204. Stefureac, R., Waldner, L., Howard, P., and Lee, J.S., *Nanopore Analysis of a Small 86-Residue Protein*. Small, 2008. **4**(1): p. 59-63.
205. Stefureac, R.I. and Lee, J.S., *Nanopore analysis of the folding of zinc fingers*. Small, 2008. **4**(10): p. 1646-50.
206. Talaga, D.S. and Li, J., *Single-Molecule Protein Unfolding in Solid State Nanopores*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(26): p. 9287-9297.
207. Payet, L., Martinho, M., Pastoriza-Gallego, M., Betton, J.-M., Auvray, L., Pelta, J., and Mathé, J., *Thermal Unfolding of Proteins Probed at the Single Molecule Level Using Nanopores*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(9): p. 4071-4076.
208. Tropini, C. and Marziali, A., *Multi-nanopore force spectroscopy for DNA analysis*. Biophys J, 2007. **92**(5): p. 1632-7.
209. Nakane, J., Wiggin, M., and Marziali, A., *A nanosensor for transmembrane capture and identification of single nucleic Acid molecules*. Biophys J, 2004. **87**(1): p. 615-21.
210. Wiggin, M., Tropini, C., Tabard-Cossa, V., Jetha, N.N., and Marziali, A., *Nonexponential kinetics of DNA escape from alpha-hemolysin nanopores*. Biophys J, 2008. **95**(11): p. 5317-23.
211. Tabard-Cossa, V., Wiggin, M., Trivedi, D., Jetha, N.N., Dwyer, J.R., and Marziali, A., *Single-molecule bonds characterized by solid-state nanopore force spectroscopy*. ACS Nano, 2009. **3**(10): p. 3009-14.
212. Keyser, U.F., van der Does, J., Dekker, C., and Dekker, N.H., *Optical tweezers for force measurements on DNA in nanopores*. Review of Scientific Instruments, 2006. **77**(10): p. 105105-9.
213. van Dorp, S., Keyser, U.F., Dekker, N.H., Dekker, C., and Lema, S.G., *Origin of the electrophoretic force on DNA in solid-state nanopores*. Nat Phys, 2009. **5**(5): p. 347-351.
214. Sischka, A., Kleimann, C., Hachmann, W., Schafer, M.M., Seuffert, I., Tonsing, K., and Anselmetti, D., *Single beam optical tweezers setup with backscattered light detection for three-dimensional measurements on DNA and nanopores*. Rev Sci Instrum, 2008. **79**(6): p. 063702.
215. Sischka, A., Spiering, A., Khaksar, M., Laxa, M., Konig, J., Dietz, K.J., and Anselmetti, D., *Dynamic translocation of ligand-complexed DNA through solid-state nanopores with optical tweezers*. J Phys Condens Matter, 2010. **22**(45): p. 454121.
216. Trepagnier, E.H., Radenovic, A., Sivak, D., Geissler, P., and Liphardt, J., *Controlling DNA Capture and Propagation through Artificial Nanopores*. Nano Letters, 2007. **7**(9): p. 2824-2830.
217. Hall, A.R., van Dorp, S., Lema, S.G., and Dekker, C., *Electrophoretic Force on a Protein-Coated DNA Molecule in a Solid-State Nanopore*. Nano Letters, 2009. **9**(12): p. 4441-4445.
218. van den Hout, M., Vilfan, I.D., Hage, S., and Dekker, N.H., *Direct Force Measurements on Double-Stranded RNA in Solid-State Nanopores*. Nano Letters, 2010. **10**(2): p. 701-707.
219. Robertson, J.W., Rodrigues, C.G., Stanford, V.M., Robinson, K.A., Krasilnikov, O.V., and Kasianowicz, J.J., *Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(20): p. 8207-11.

220. Reiner, J.E., Kasianowicz, J.J., Nablo, B.J., and Robertson, J.W.F., *Theory for polymer analysis using nanopore-based single-molecule mass spectrometry*. Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2010. **107**(27): p. 12080-12085.
221. Baaken, G., Ankri, N., Schuler, A.-K., Rühe, J., and Behrends, J.C., *Nanopore-Based Single-Molecule Mass Spectrometry on a Lipid Membrane Microarray*. ACS Nano, 2011. **5**(10): p. 8080-8088.
222. Oukhaled, G., Bacri, L., Mathé, J., Pelta, J., and Auvray, L., *Effect of screening on the transport of polyelectrolytes through nanopores*. EPL (Europhysics Letters), 2008. **82**(4): p. 48003.
223. Gibrat, G., Pastoriza-Gallego, M., Thiebot, B., Breton, M.-F., Auvray, L., and Pelta, J., *Polyelectrolyte Entry and Transport through an Asymmetric  $\alpha$ -Hemolysin Channel*. The Journal of Physical Chemistry B, 2008. **112**(47): p. 14687-14691.
224. Teixeira, L.R., Merzlyak, P.G., Valeva, A., and Krasilnikov, O.V., *Interaction of heparins and dextran sulfates with a mesoscopic protein nanopore*. Biophys J, 2009. **97**(11): p. 2894-903.
225. Bacri, L., Oukhaled, A., Hémon, E., Bassafoula, F.B., Auvray, L., and Daniel, R., *Discrimination of neutral oligosaccharides through a nanopore*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011. **412**(4): p. 561-564.
226. Bezrukov, S.M., Kullman, L., and Winterhalter, M., *Probing sugar translocation through maltoporin at the single channel level*. FEBS Letters, 2000. **476**(3): p. 224-228.
227. Kullman, L., Winterhalter, M., and Bezrukov, S.M., *Transport of maltodextrins through maltoporin: a single-channel study*. Biophys J, 2002. **82**(2): p. 803-12.
228. Van Gelder, P., Dumas, F., Rosenbusch, J.P., and Winterhalter, M., *Oriented channels reveal asymmetric energy barriers for sugar translocation through maltoporin of Escherichia coli*. Eur J Biochem, 2000. **267**(1): p. 79-84.

---

## II. Chapitre 2 :

# Confinement et translocation d'oligo-glycosaminoglycanes à travers un nanopore protéique

---

<b>II.1.</b>	<b><i>Les différents polysaccharides analysés</i></b>	<b>105</b>
<b>II.2.</b>	<b><i>Principe des expériences de nanopore</i></b>	<b>106</b>
<b>II.3.</b>	<b><i>Influence de différents paramètres sur la translocation</i></b>	<b>107</b>
<b>II.4.</b>	<b><i>Translocation de glycosaminoglycanes à travers le pore d'aérolysine</i></b>	<b>117</b>
<b>II.5.</b>	<b><i>Détection MS de la translocation</i></b>	<b>124</b>
<b>II.6.</b>	<b><i>Translocation d'oligosaccharides d'héparine à travers l'aérolysine</i></b>	<b>127</b>
<b>II.7.</b>	<b><i>Translocation de différents polysaccharides à travers l'<math>\alpha</math>-hémolysine</i></b>	<b>130</b>
<b>II.8.</b>	<b><i>Conclusion</i></b>	<b>140</b>
<b>II.9.</b>	<b><i>Références bibliographiques</i></b>	<b>141</b>



J'expose dans cette partie mes travaux consacrés au développement d'une méthode d'analyse de polysaccharides par nanopore. Je me suis particulièrement intéressé à deux représentants de la famille des glycosaminoglycanes : l'acide hyaluronique et l'héparine. Ces polysaccharides sont assemblés par répétition d'unités disaccharidiques formant ainsi de longues chaînes linéaires. Situés principalement à la surface des cellules et dans la matrice extracellulaire, ces GAGs interviennent dans les interactions entre cellules ou entre une cellule et la matrice extracellulaire et sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques et pathologiques telles que le développement embryonnaire, la croissance cellulaire, l'homéostasie, les réponses inflammatoires, etc. [1, 2]. De par leur vaste diversité structurale, leur analyse est très complexe. Récemment introduite, l'utilisation de nanopore protéique a permis la détection et la caractérisation de différentes molécules à l'échelle de la molécule unique, telle que des acides nucléiques [3, 4], des protéines [5-7] ou des polymères [8-10]. Cependant, cette méthode n'a que très rarement été appliquée à l'étude des polysaccharides [11, 12].

Pour cela, nous avons d'abord étudié l'influence de différents paramètres sur la translocation des molécules à travers le pore, pour trouver les meilleures conditions expérimentales. Après quoi, la translocation d'oligosaccharides d'acide hyaluronique et d'héparine à travers un nanopore d'aérolysine puis à travers un nanopore d' $\alpha$ -hémolysine a été étudiée. Enfin, deux autres polysaccharides sulfatés, le dermatane sulfate et le dextrane sulfate ont été analysés par translocation à travers un nanopore d' $\alpha$ -hémolysine.

## II.1. Les différents polysaccharides analysés

L'acide hyaluronique a été étudié dans un premier temps. Ce polysaccharide constitue le glycosaminoglycane le plus simple du fait qu'il ne possède aucun groupement sulfaté. Il s'agit d'une chaîne linéaire dont la charge (négative) lui est conférée uniquement par des groupements carboxyliques. Il est composé par la répétition d'un dimère, un acide D-glucuronique (GlcA) et une N-acétyl-glucosamine (GlcNAc) reliés par des liaisons  $\beta(1\rightarrow3)$ . Les disaccharides sont reliés entre eux par des liaisons  $\beta(1\rightarrow4)$  (Figure 61).

Nous avons analysé les oligosaccharides suivants : l'hexasaccharide (1136,3 g/mol), l'octasaccharide (1515,4 g/mol) et le décasaccharide (1894,5 g/mol) de l'acide hyaluronique ainsi que le polysaccharide complet ( $1,63 \cdot 10^6$  g/mol). Toutes ces chaînes sont linéaires. Les oligosaccharides sont issus d'une dépolymérisation enzymatique de l'acide hyaluronique par la hyaluronidase de testicules bovins (E.C. 3.2.1.35, Sigma) comme décrit par Price K.N. *et al.* [13].

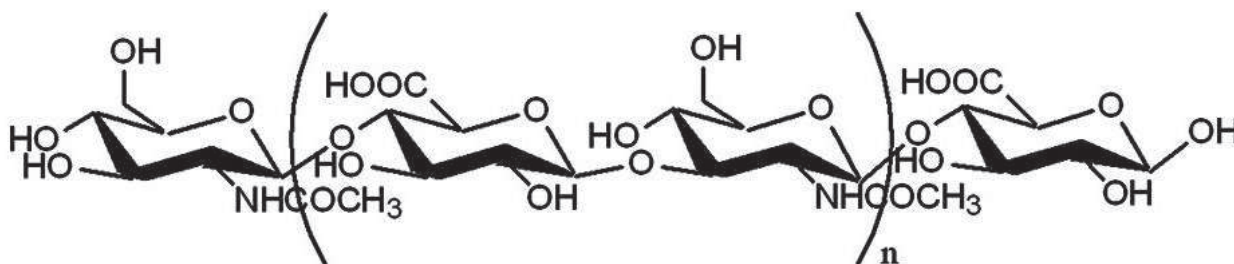
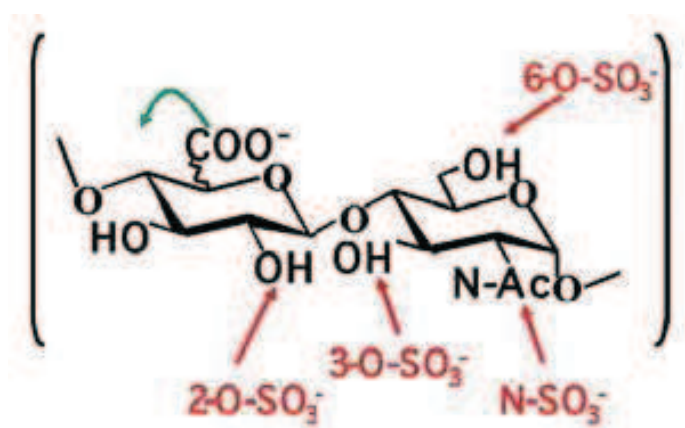


Figure 61 : Structure de l'acide hyaluronique. Les unités disaccharidiques sont toutes les mêmes et ne se différencient pas les unes des autres.

L'héparine, un polysaccharide hautement sulfaté, fréquemment utilisé comme anticoagulant, a été étudié dans un second temps. Le disaccharide constitutif de l'héparine contient un acide glucuronique (GlcA) ou un acide L-iduronique (IdoA) liés à une glucosamine (GlcN) par une liaison  $\beta(1\rightarrow4)$  et  $\alpha(1\rightarrow4)$ , respectivement. Les différents disaccharides sont reliés entre eux par des liaisons  $\alpha(1\rightarrow4)$  [14, 15]. A la différence des oligosaccharides de l'acide hyaluronique, les oligosaccharides d'héparine sont très hétérogènes, possédant plusieurs structures et tailles différentes en solution. L'acide glucuronique peut être épimérisé en acide iduronique et le disaccharide peut être 6-O-sulfaté, 3-O-sulfaté et/ou N-sulfaté sur la glucosamine. A cela s'ajoute également une 2-O-sulfatation de l'acide iduronique/glucuronique. Toutes ces modifications peuvent avoir lieu séparément ou ensemble ou alors certaines modifications peuvent avoir lieu et d'autres non. Ces modifications augmentent énormément la diversité structurale de l'héparine, pour laquelle on ne dénombre pas moins de 48 unités disaccharides différentes, ce qui porte à 2304 le nombre de tétrasaccharides possibles et à plus de 5 millions le nombre d'octasaccharides existant. Cette diversité rend la caractérisation de l'héparine très difficile.



**Figure 62 :** Structure de l'héparine avec les différentes possibilités pour les isomères (épimérisation en vert et/ou les différentes sulfatations possibles en rouge).

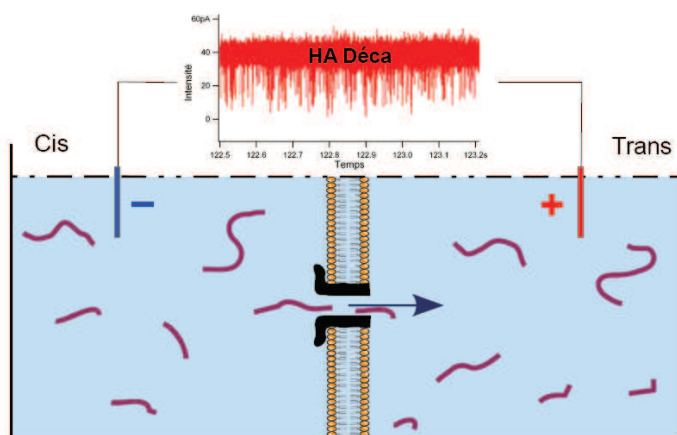
Les techniques d'analyses habituelles, comme la RMN par exemple, présentent un inconvénient majeur pour l'analyse de ces biomolécules : les résultats obtenus correspondent à une moyenne de toutes les populations présentes en solution. La spectrométrie de masse permet d'observer toutes les molécules présentes mais dans le cas d'un échantillon trop hétérogène, le spectre devient trop compliqué pour être analysé. Nous proposons ici d'utiliser une technique à l'échelle de la molécule unique, basée sur le passage des molécules, l'une après l'autre, à travers un canal protéique. Ainsi, il devrait être possible d'obtenir des informations sur chaque population présente en solution.

## II.2. Principe des expériences de nanopore

Au cours d'une expérience de nanopore, deux compartiments remplis avec chacun 1 mL du tampon HEPES 5 mM, KCl 1 M, pH 7,5 sont séparés par une membrane lipidique dans laquelle un pore est inséré. Dans le cadre de cette thèse, les nanopores utilisés sont des canaux d'aérolysine ou d' $\alpha$ -hémolysine (Cf. Chapitre IV).



Un potentiel de 70 mV pour l'aérolysine, et 100 mV pour l' $\alpha$ -hémolysine, considérés comme des valeurs optimales pour chacun de ces deux pores, est appliqué de part et d'autre de la membrane. L'aérolysine possède un diamètre interne plus petit que l' $\alpha$ -hémolysine, on peut donc penser que cela entraînera une meilleure résolution temporelle mais il peut être bloqué par les oligosaccharides trop larges. L'addition de polysaccharides dans le compartiment *cis* résulte en de nombreux blocages du courant, dus à leur interaction avec le nanopore. Ces blocages du courant sont caractérisés par leur durée, leur fréquence et leur amplitude, pouvant être reliées aux paramètres structuraux (charge, forme, ...) ainsi qu'à la concentration en solution des molécules traversant le pore. La [Figure 63](#) ci-dessous schématise ce principe.



[Figure 63](#) : Schéma représentant le principe de fonctionnement des expériences nanopore.

### II.3. Influence de différents paramètres sur la translocation

Pendant les analyses de molécules par nanopore, plusieurs paramètres peuvent être modifiés pour obtenir un meilleur signal. Ces différents paramètres concernent la nature du pore utilisé et son sens d'insertion dans la membrane, l'intensité du courant de pore ouvert, l'influence de la force ionique ainsi que la limite de détection.

#### II.3.1. Nature du pore utilisé

Le pore utilisé, que ce soit l'aérolysine ou l' $\alpha$ -hémolysine, entraîne des différences d'analyses. Indépendamment du type de molécules à analyser, la première différence observable concerne les intensités de ces deux pores. Le pore d'aérolysine laisse passer un courant de  $+32 \pm 4$  /  $-35 \pm 4$  pA pour une tension de  $\pm 70$  mV tandis que le pore d' $\alpha$ -hémolysine laisse passer un courant résiduel de  $99 \pm 6,5$  pA [11] pour une tension de  $\pm 100$  mV, à 1M KCl. De plus, le diamètre interne est sensiblement similaire bien que celui de l'aérolysine est estimé être légèrement plus faible (la taille exacte de l'aérolysine n'est pas connue mais est estimée comprise entre 1 et 1,7 nm contre 1,5 nm pour l' $\alpha$ -hémolysine), ce qui pourrait entraîner un confinement plus important dans le pore d'aérolysine. Cependant, la différence la plus importante concerne la charge du nanopore. Le pore d'aérolysine possède une charge globale nette très négative (estimée à -52 charges élémentaires à pH 7,5 d'après une simulation prenant en compte les charges des

différents acides aminés du monomère [16]) alors que la charge globale nette de l' $\alpha$ -hémolysine est en valeur absolue plus faible et opposée, avec +7 charges élémentaires à pH 7,5. Les interactions électrostatiques dans les différents pores seront donc différentes. Ces différences sont reprises dans le [Tableau 3](#).

	Aérolysine	$\alpha$ -hémolysine
Diamètre interne	1 - 1,7 nm	1,5 nm
Intensité mesurée à + 70 mV	$32 \pm 4$ pA	$65 \pm 4$ pA
Intensité mesurée à + 100 mV	$47 \pm 5$ pA	$99 \pm 6,5$ pA
Charges à pH 7,5	- 52 e	+ 7 e

[Tableau 3](#) : Récapitulatif des différences entre l'aérolysine et l' $\alpha$ -hémolysine.

### II.3.2. Variations du courant de pore ouvert

Lors d'une expérience, on définit le courant de pore ouvert comme la valeur de l'intensité correspondant au flux d'ions traversant le canal lorsqu'aucune molécule n'est présente. Celui-ci peut être plus ou moins important en fonction de la tension appliquée, la force ionique et la température. De plus, dès lors qu'une membrane est formée, le bruit électrique ne varie que très peu. Ainsi, en modifiant le courant de pore ouvert à l'aide de ces paramètres cités ci-dessus, le rapport signal/bruit peut être modulé pour faciliter les analyses.

#### II.3.2.a. Tension appliquée

L'intensité du courant observée est proportionnelle à la tension appliquée, en accord avec la loi d'Ohm, tandis que le bruit électrique ne varie pas. Ainsi, plus elle sera élevée et plus l'intensité du courant le sera aussi, améliorant le rapport signal/bruit et donc la qualité de l'analyse.

En général, un analyte donné doit franchir une barrière de potentiel avant d'entrer dans le pore, cette barrière correspond souvent à des effets stériques d'origine entropique. La hauteur de cette barrière d'énergie peut être réduite en appliquant une différence de potentiel. Il existe donc une tension minimale nécessaire à appliquer pour obtenir un phénomène de translocation. Cela peut conduire à un problème si l'ouverture du canal dépend de la tension électrique appliquée.

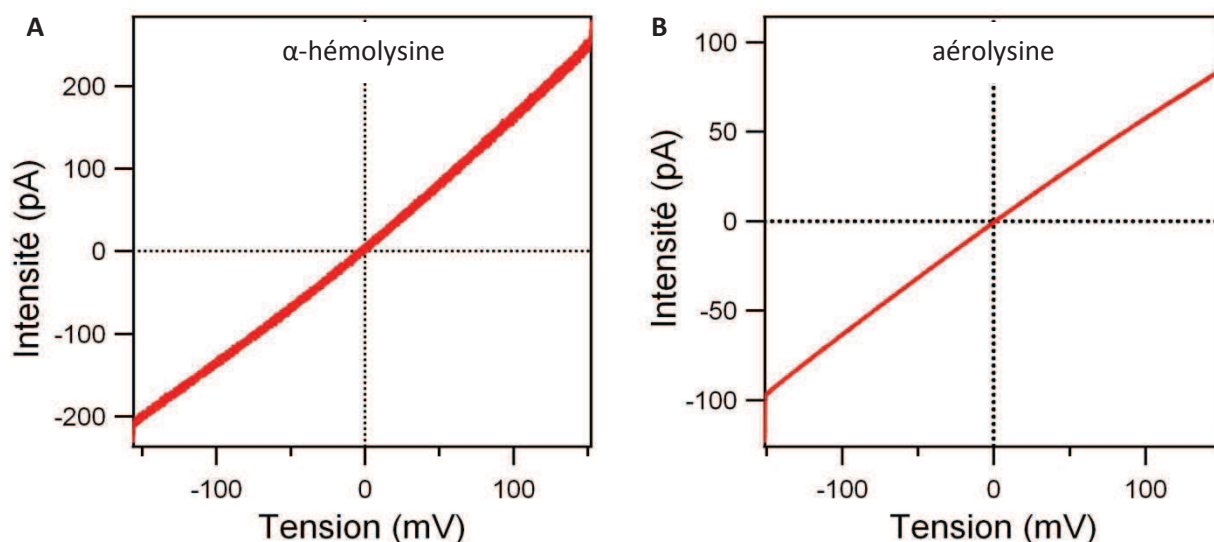


Figure 64 : Courbe Intensité/Potentiel des pores (A) d'α-hémolysine et (B) d'aérolysine à 1M KCl.

C'est le cas du pore d'aérolysine. Le canal est très instable dès que le potentiel appliqué dépasse 80 mV [17]. Les courbes Intensité-Potentiel (courbes I-V du courant traversant les pores d'α-hémolysine et d'aérolysine en fonction de la tension appliquée) mesurées à vide sont représentées sur la Figure 64. On observe que les droites se courbent aux tensions élevées et présentent une faible déviation par rapport à la loi d'Ohm et une asymétrie de polarité. Les valeurs de courant à + et – 70 mV pour l'aérolysine sont ainsi de  $+32 \pm 4$  pA dans le sens positif et  $-35 \pm 4$  pA dans le sens négatif (Cf. partie II.3.1). Cela est dû à une asymétrie de répartition des charges (les charges en entrée et en sortie de pore ne sont pas les mêmes) à l'intérieur du pore. Cette dissymétrie nous permet de détecter rapidement dans quel sens se trouve le pore (avec le vestibule face au compartiment *cis* et la tige face au compartiment *trans* ou à l'inverse, le vestibule face au compartiment *trans* et la tige face au compartiment *cis*). Les deux courbes ci-dessus correspondent toutes les deux au sens des pores d'α-hémolysine et d'aérolysine que j'ai utilisés tout au long de mes expériences de thèse.

### II.3.2.b. Effet de la force ionique

La force ionique fait également varier l'intensité de pore ouvert. Ainsi, plus la concentration en KCl est grande, plus la conductivité de la solution est grande et plus l'intensité mesurée est élevée. L'augmentation de la force ionique ne semble pas changer l'intensité du bruit électrique ambiant.

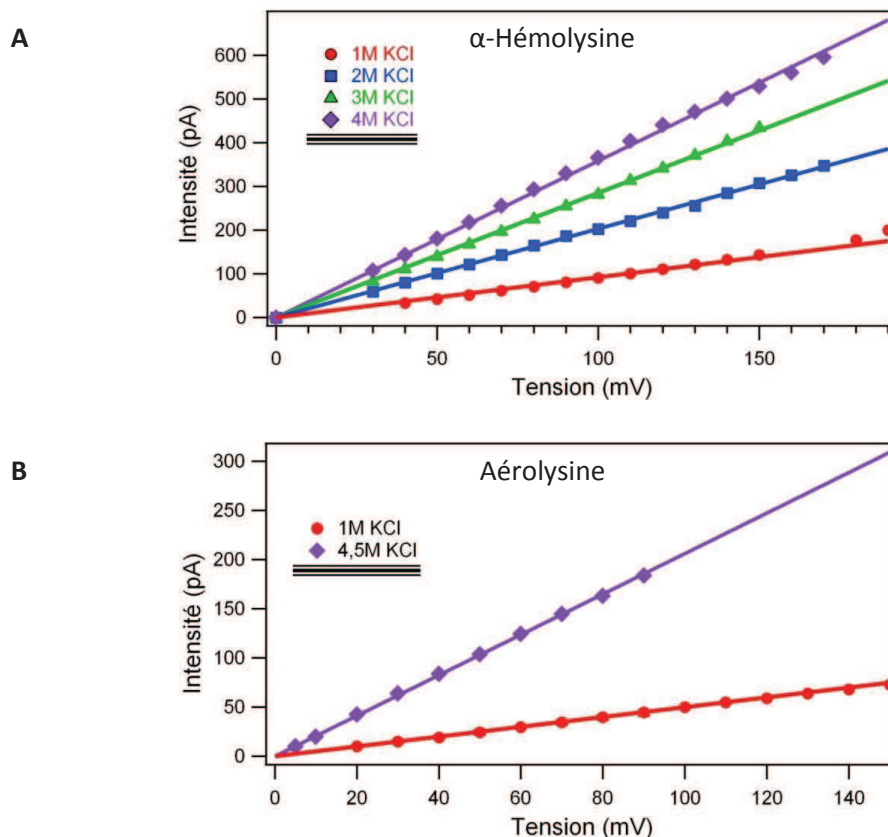


Figure 65 : Evolution de l'intensité à différentes forces ioniques, en fonction de la tension appliquée pour un pore (A) d'α-hémolysine ou (B) d'aérolysine.

Les courbes intensité-potential à travers les 2 pores (aérolysine et α-hémolysine) ont été mesurées en fonction de la force ionique (Figure 65). On observe sur la Figure 66 que la dépendance de l'intensité de pore ouvert en fonction de la force ionique est linéaire. On peut donc prévoir l'intensité de pore ouvert en fonction de la concentration en KCl utilisée.

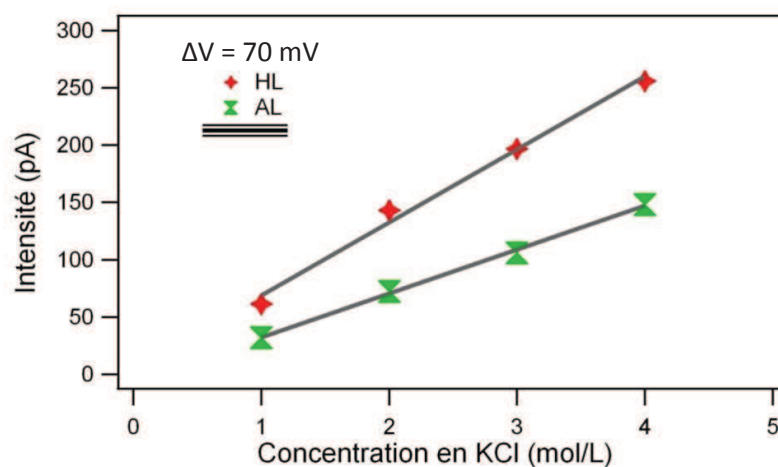
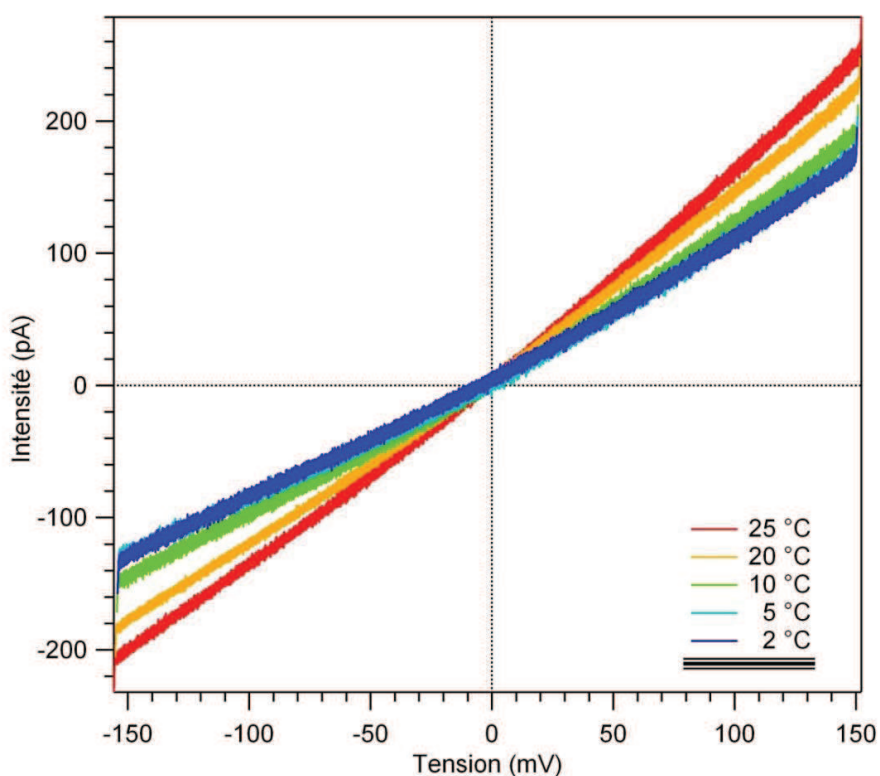


Figure 66 : Evolution de l'intensité à  $\Delta V = 70$  mV pour les pores d'aérolysine (les points verts) et d'α-hémolysine (les points rouges) en fonction de la concentration en KCl.

### II.3.2.c. Effet de la température

Baisser la température diminue en général la vitesse de translocation des molécules étudiées [18-20] et s'accompagne d'effets observables sur la conductivité ionique. Celle-ci dépend fortement de la température, qui affecte beaucoup la viscosité de l'eau et la mobilité des ions. Cet effet est visible sur la [Figure 67](#), qui montre plusieurs courbes Intensité-Potentiel (courbes IV) enregistrées à différentes températures entre 2 (en bleu) et 25 °C (en rouge). Le courant ionique diminue lorsque la température baisse [21] comme on s'y attend.



[Figure 67](#) : Superposition de courbes Intensité/Potentiel d'un pore d' $\alpha$ -hémolysine faites à différentes températures, à 1M KCl.

L'évolution de l'intensité en fonction de la température est linéaire dans la gamme observée ([Figure 68](#)). L'intensité passe de + 132 pA pour une tension de + 120 mV, à 25 °C, à + 86 pA à la même tension pour une température de 2 °C. On observe également une légère augmentation du bruit ambiant lorsque la température diminue ([Figure 69](#)).

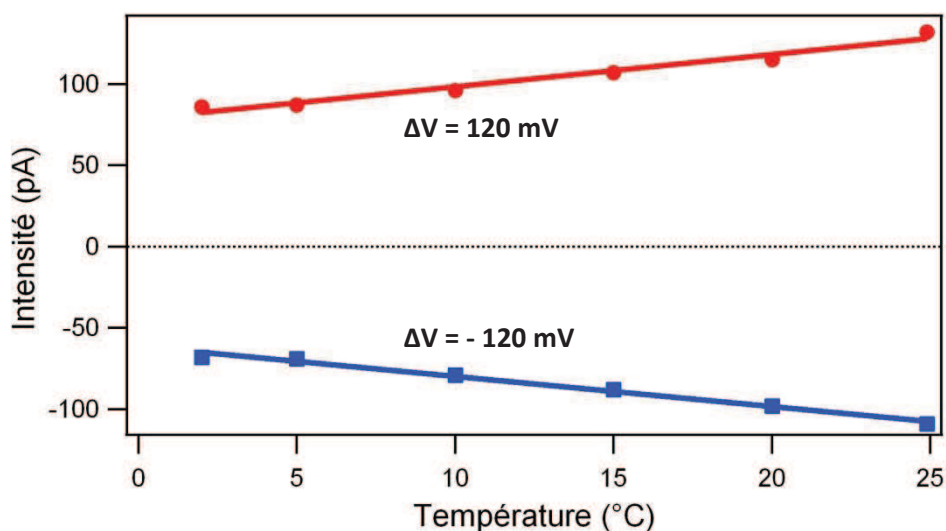


Figure 68 : Evolution de l'intensité d'un pore d'α-hémolysine en fonction de la température aux tensions de +120 mV (en rouge) et -120 mV (en bleu).

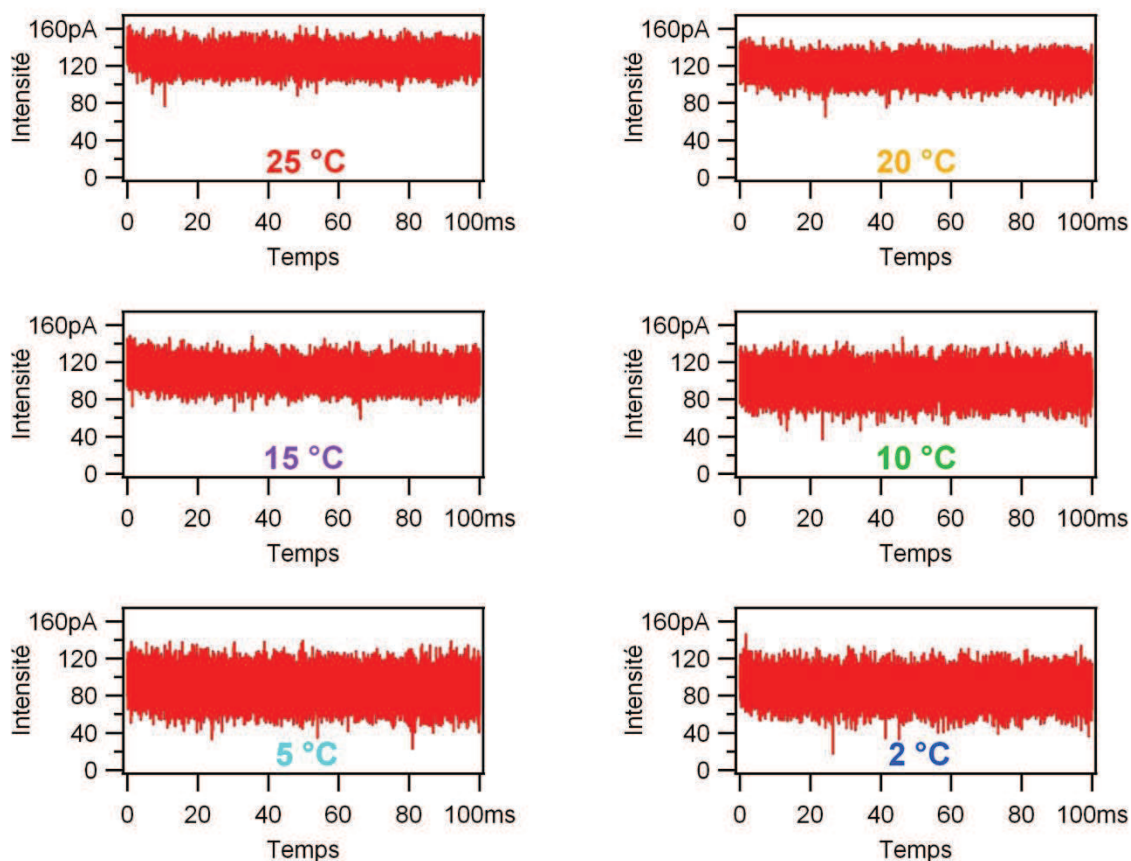


Figure 69 : Différentes traces enregistrées à différentes températures dans la gamme 2°C – 25 °C à 120 mV, dans une solution tampon HEPES 5 mM, KCl 1 M, pH 7,5.



Pour résumer, le courant de pore ouvert est proportionnel à la tension, la force ionique et la température, leur augmentation améliore le rapport signal/bruit en augmentant le courant mesuré. Nous devons toutefois rester dans certaines limites imposées par les systèmes étudiés :

- ✓ les pores d'aérolysine se bloquent fréquemment lorsque la tension appliquée est trop forte. La tension appliquée est fixée dans la suite à  $\pm 70$  mV pour l'aérolysine et  $\pm 100$  mV pour l' $\alpha$ -hémolysine.
- ✓ Lorsque la force ionique est élevée, la membrane de lipide se forme et s'affine plus difficilement. L'évaporation dans les deux compartiments est plus rapide, entraînant une concentration du KCl, et modifiant les conditions d'analyse. La concentration en KCl a été fixée à 1 M sauf pour les expériences avec l'héparine nécessitant des forces ioniques plus élevées.
- ✓ La température influe sur les durées de translocation des molécules. Si la température est trop élevée les molécules traversent le pore trop rapidement pour être détectée. La température des expériences restera la température ambiante, sauf exception.

### II.3.3. Limite de détection en concentration de polysaccharides

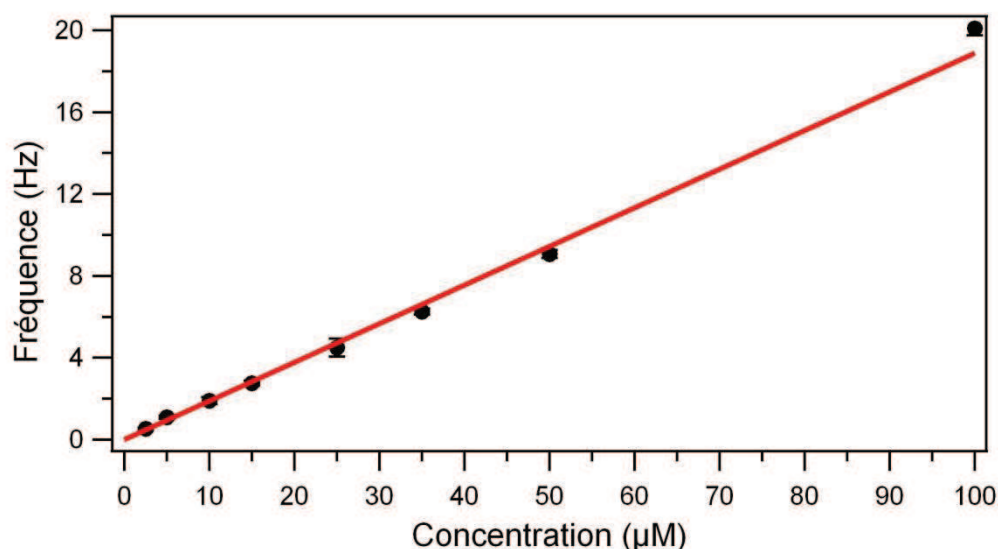
La technique des nanopores est très sensible mais nécessite une quantité minimale de molécules pour pourvoir un signal significatif dans le temps de l'expérience (au maximum la journée). La fréquence des passages dans le pore utilisé est proportionnelle à la concentration en analyte. Les premières études sur l'acide hyaluronique ont été faites à des concentrations en oligosaccharide de l'ordre du millimolaire pour pouvoir obtenir des fréquences suffisamment élevées (200 passages par seconde) et une bonne distribution statistique en un temps réduit. Par la suite, des tests à concentrations plus faibles (jusqu'à 1  $\mu$ M) ont été effectués afin de réduire la consommation d'oligosaccharide par analyse.

Les fréquences d'événements à travers un pore d'aérolysine ont été mesurées pour différentes concentrations d'un décasaccharide de l'acide hyaluronique, et tracées sur la courbe de la [Figure 70](#). Il faut, d'après les résultats obtenus pendant cette étude, un minimum de 1000 événements pour analyser un enregistrement avec une bonne statistique. A l'aide de la courbe d'étalonnage ci-dessous ([Figure 70](#)), il est possible d'estimer la concentration et la durée minimales nécessaires pour un enregistrement.

On vérifie que la fréquence des événements est proportionnelle à la concentration en molécules introduites en solution, comme cela a déjà été décrit dans la littérature [22-24]. On trouve la relation suivante donnant la fréquence  $f$  à travers un pore d'aérolysine, en fonction de la concentration  $C$  :

$$f = 0,1889 \pm 0,0025 \times C.$$

Avec  $f$  la fréquence de blocage en Hz et  $C$  la concentration en analyte en solution, en  $\mu$ M.



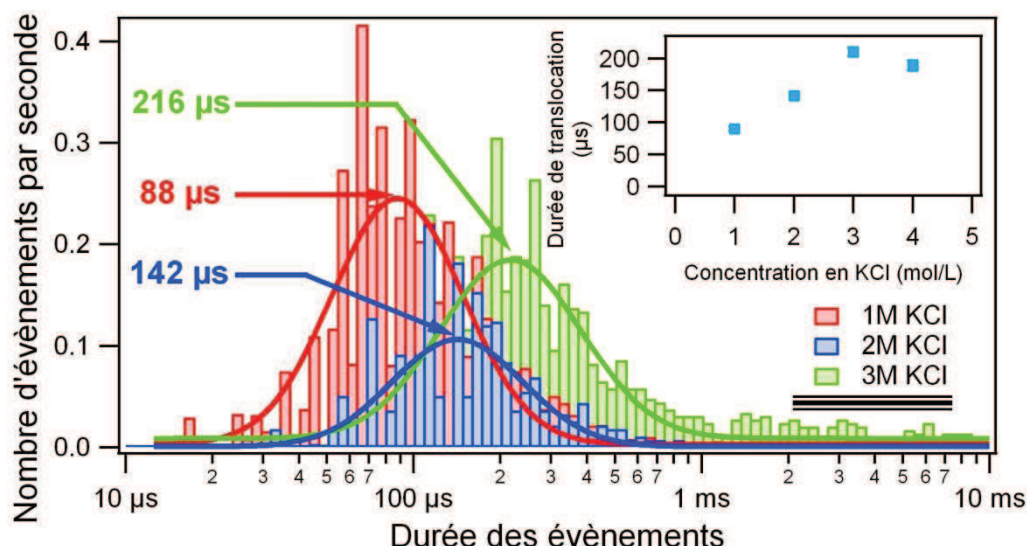
**Figure 70** : Relation linéaire entre la fréquence de blocage et la concentration en molécules de décasaccharides en solution dans KCl 1 M, 5 mM HEPES, pH 7,5.  $\Delta V = 70$  mV.

Pour une concentration de 100  $\mu\text{M}$ , la fréquence des passages est de  $20,1 \pm 0,35$  Hz. Si les données sont enregistrées pendant 5 minutes, 6000 événements sont enregistrés ce qui est amplement suffisant pour un traitement statistique. Des acquisitions d'une durée de 5 minutes et une concentration minimale comprise entre 15 et 20  $\mu\text{M}$  suffit à réaliser une expérience quantitativement exploitable.

### II.3.4. Influence de la force ionique sur le confinement et le transport

Les expériences de nanopore publiées sur le poly(éthylène glycol) montrent que le temps de translocation des molécules augmentent quand la force ionique augmente. Cela est probablement dû à une baisse de la solubilité des molécules et à un accroissement des interactions attractives entre les polymères et le pore. Nous observons un effet similaire avec des polysaccharides (un décasaccharide de l'acide hyaluronique passant à travers un pore d'aérolysine).

L'analyse statistique des événements de translocation est représentée sur la [Figure 71](#). Les histogrammes normalisés (nombre d'événements en fonction de leur durée) correspondant à différentes expériences effectuées à des concentrations de KCl croissantes de 1 M, 2 M et 3 M. Les histogrammes sont ajustés par des fonctions LogNormal. Le sommet des distributions correspond au temps de translocation le plus probable des molécules. Les durées de translocation sont tracées dans l'encart de la [Figure 71](#) en fonction de la concentration en KCl. Le temps de translocation se stabilise au-delà de 3 M en KCl. L'effet de la force ionique est très sensible et permet d'augmenter la sensibilité d'expériences de type « spectrométrie de masse » telles qu'elles sont réalisées par John Kasianowicz et Jan Behrends sur le PEG.



**Figure 71** : Evolution du temps de translocation avec l'augmentation de la concentration en KCl, dans KCl 1 M (en rouge), 2 M (en bleu) ou 3 M (en vert), 5 mM HEPES, pH 7,5.  $\Delta V = 70$  mV. Les distributions sont normalisées pour une durée d'expérience de 1 seconde.

La fréquence évolue également mais de manière assez complexe, et est analysée plus en détail en partie II.7.5. On peut également observer une faible évolution du taux de blocage, les analyses effectuées à 3 et 4 M en KCl présentant des taux de blocage légèrement plus importants que dans le cas des analyses effectuées à 1 et 2 M en KCl.

### II.3.5. Asymétrie d'entrée et de passage de l'acide hyaluronique à travers l'aérolysine

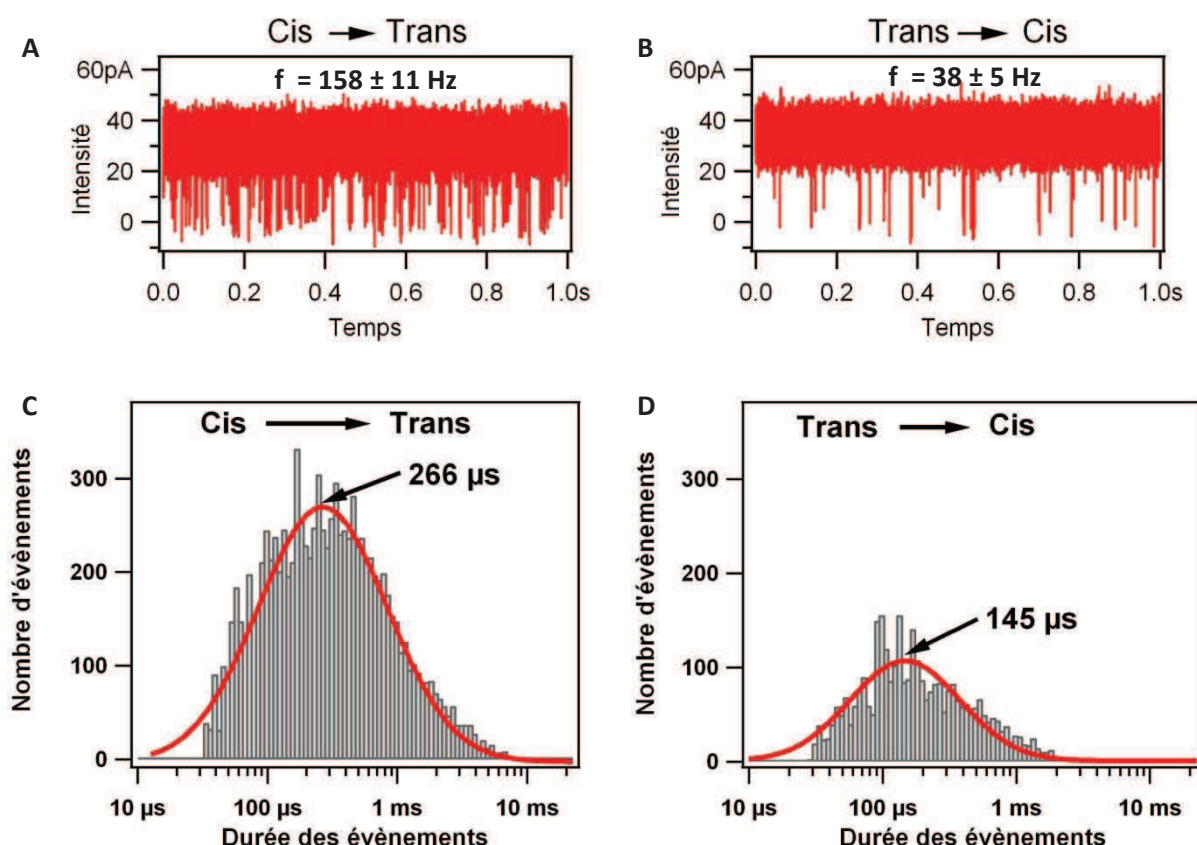
Le dernier paramètre étudié est le sens du transport des molécules à travers le pore d'Aérolysine. En fonction de la polarité de la tension appliquée et du compartiment où sont initialement placées les molécules, les molécules peuvent traverser le pore dans l'un ou l'autre sens. Nous appelons compartiment *cis* le compartiment reliée à la masse et comportement *trans* celui où une tension positive ou négative) est appliquée. L'Aérolysine est initialement solubilisée dans le compartiment *cis* et s'insère sauf exception avec le disque du côté *cis*. Il arrive que le pore se forme de façon inversée lorsque quelques monomères d'aérolysine réussissent à franchir le trou séparant les deux compartiments (au moment où la membrane se casse par exemple). La mesure des courbes intensité-potential nous permet de déterminer l'orientation des pores. Nous observons que plus de 75 % des pores d'aérolysine formés présentent respectivement des courants de  $+32 \pm 4$  à 70 mV et de  $-35 \pm 4$  pA à - 70 mV, seuls ceux-ci sont conservés pour les analyses.

Des molécules anioniques, initialement en *cis*, se dirigent donc du compartiment *cis* vers le compartiment *trans* en entrant par le vestibule lorsqu'une tension positive est appliquée. C'est l'inverse lorsque les molécules sont initialement en *trans* et qu'une tension négative est appliquée.

La [Figure 72](#) montre les traces obtenues lors de la translocation d'un mélange d'oligosaccharides courts de l'acide hyaluronique à travers l'Aérolysine dans les deux sens différents.

Les fréquences d'événements dans le cas où les molécules vont du compartiment *cis* vers le compartiment *trans* sont beaucoup plus élevées que lorsqu'elles passent dans l'autre sens ( $158 \pm 11$  Hz dans le premier cas,  $38 \pm 5$  Hz dans le second cas à 60 mV).

Mentionnons que le canal d'Aérolysine apparaît moins stable (et transite vers un état bloquant) lorsqu'on applique un potentiel négatif, ce qui est en partiel désaccord avec les observations de Wilmsen *et al.* [17].



**Figure 72 :** Différences de fréquences d'événements en fonction du côté par où rentrent les molécules dans le pore. Les molécules, un mélange d'oligosaccharides de l'acide hyaluronique, traversent le pore (A) du compartiment *cis* vers le compartiment *trans* ou (B) du compartiment *trans* vers le compartiment *cis*. (C) et (D) Histogramme des durées d'événements correspondants au passage (C) du compartiment *cis* vers le *trans* et (D) du *trans* vers le *cis*.

Les temps de translocation sont également affectés par l'orientation du pore,  $274 \pm 19$  μs dans le sens *cis-trans* et  $136 \pm 9$  μs dans le sens inverse.

Ces observations sont paradoxales car on s'attendrait à associer des fréquences élevées à des passages rapides. Dans les deux situations étudiées, les molécules d'acide hyaluronique font face à un éventuel courant électro-osmotique (associé à une charge de surface négative). Nos données suggèrent que la barrière d'entrée (contrôlant les fréquences de passage) est plus basse du côté *cis* que du côté *trans*. Au contraire, le paysage énergétique à l'intérieur du pore apparaît plus favorable au passage dans le sens *trans-cis*. L'ensemble de ces observations pourrait être expliqué si on avait des charges positives à l'entrée

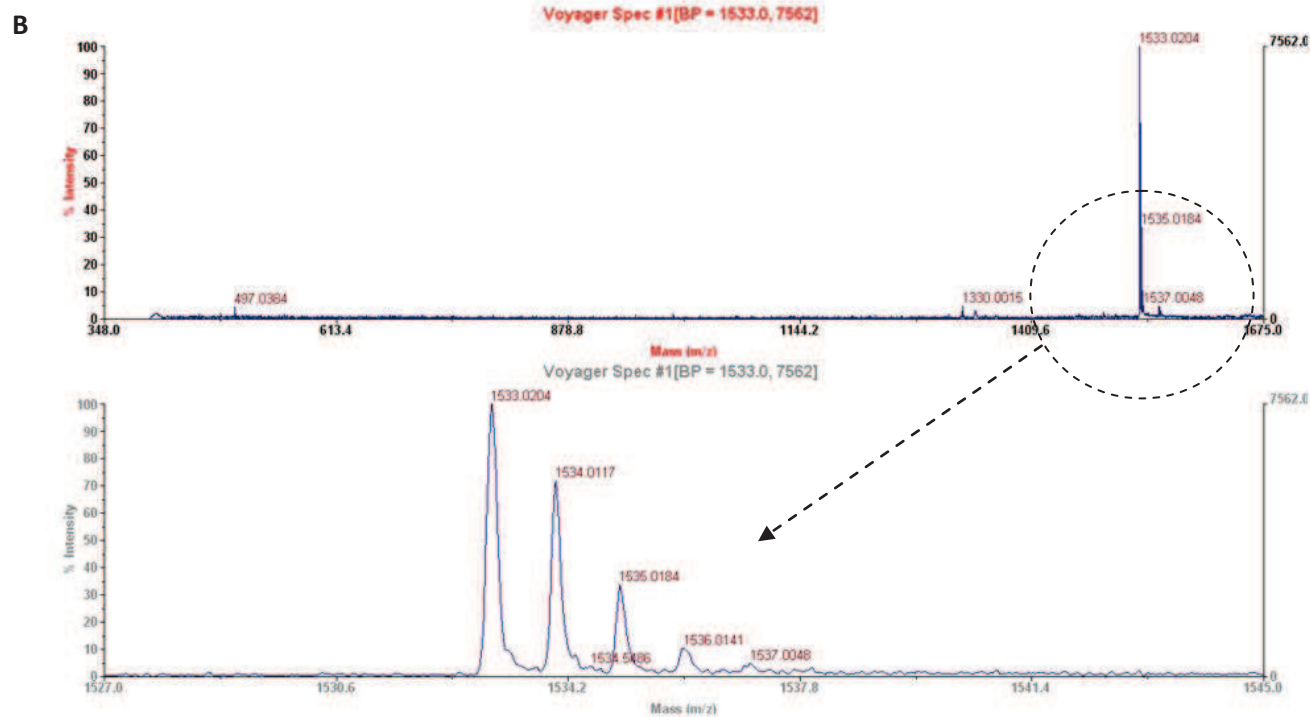
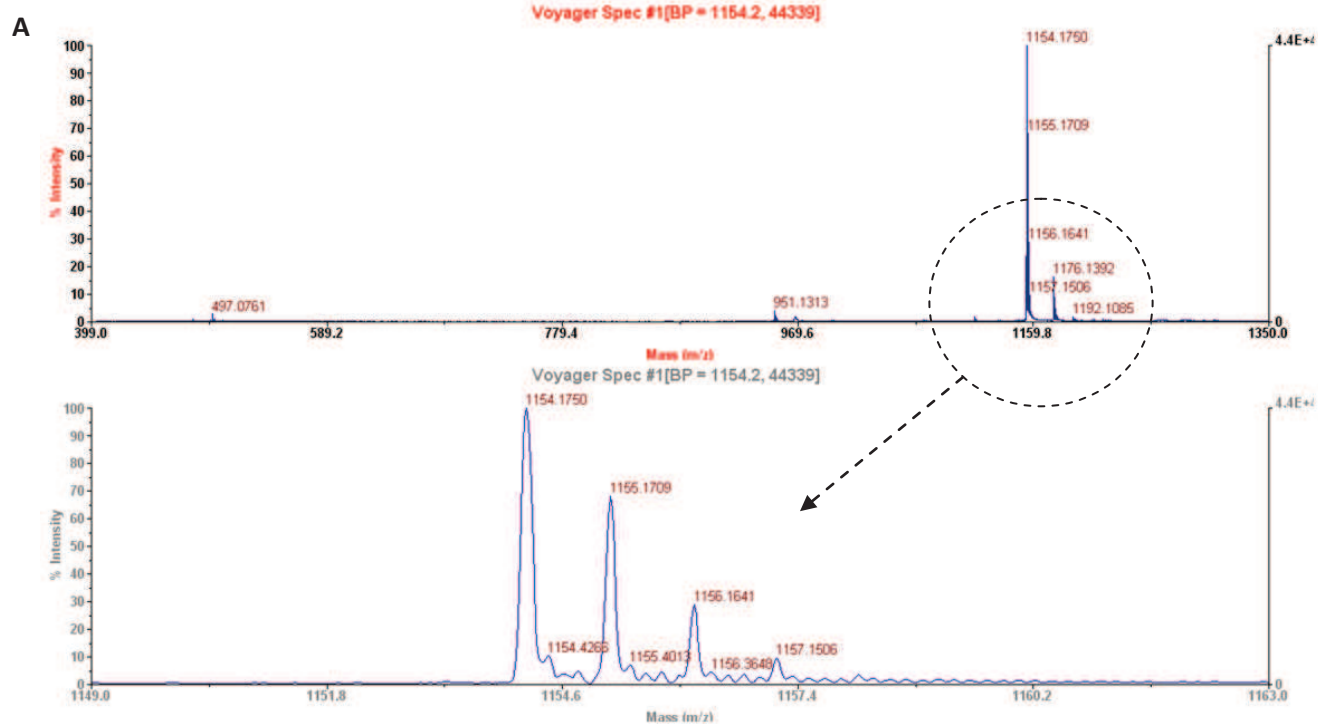
du vestibule (coté *cis*) et des charges négatives coté *trans*. Les charges positives favoriseraient l'entrée des molécules anioniques côté *cis*, mais les charges négatives côté *trans* freineraient le passage dans le sens *cis-trans*. Nous ignorons malheureusement la distribution réelle des charges électriques dans l'Aérolysine. L'hypothèse d'une dissymétrie de la répartition de charge est en tout cas compatible avec la dissymétrie de structure de la molécule et avec la sensibilité de la molécule au potentiel. Ajoutons qu'à ces effets électrostatiques peuvent s'ajouter des effets entropiques et stériques si la largeur du canal d'Aérolysine n'est pas la même du coté *cis* et du coté *trans* [25, 26].

Il est donc plus simple du point de vue expérimental d'effectuer les expériences avec les molécules traversant le pore du compartiment *cis* vers le compartiment *trans* aussi bien pour avoir des fréquences plus importantes que pour ralentir la translocation des molécules.

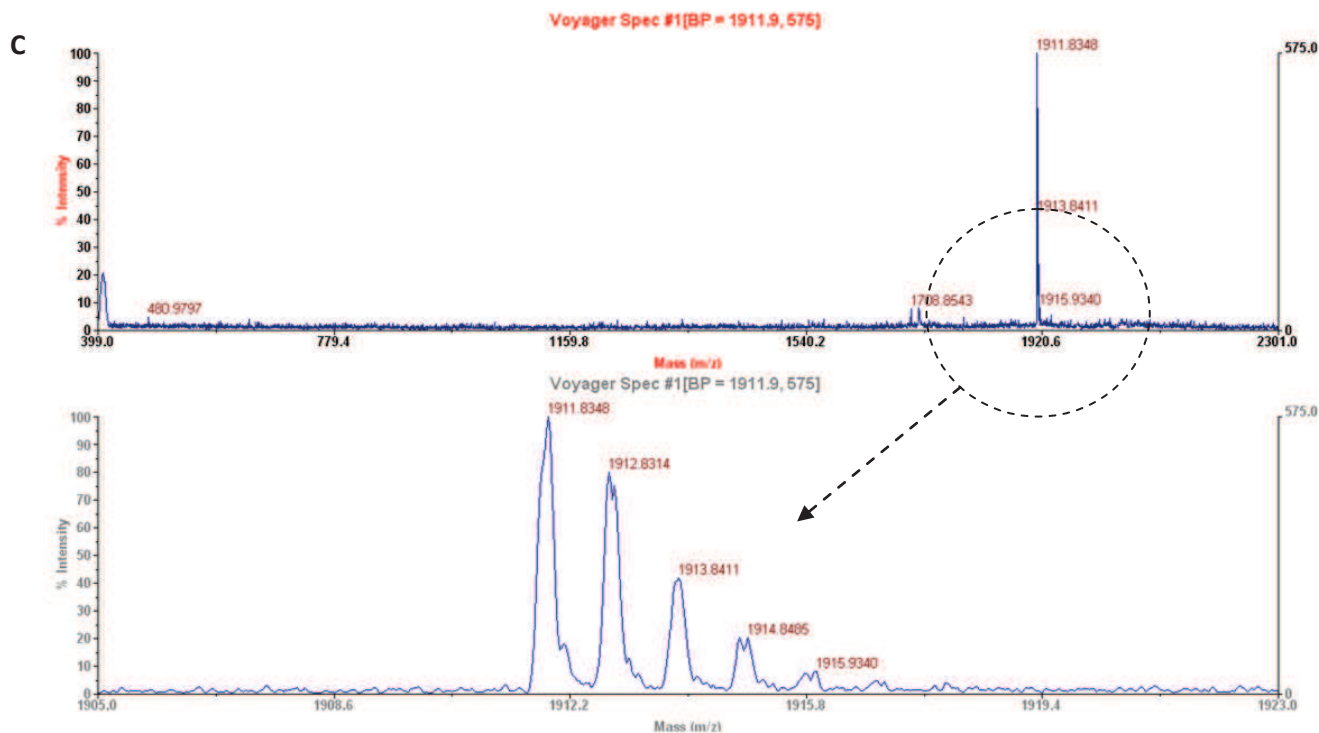
## **II.4. Translocation de glycosaminoglycanes à travers le pore d'aérolysine**

### **II.4.1. Caractérisation et analyse des oligosaccharides d'acide hyaluronique monodisperses**

Les molécules analysées sont l'hexasaccharide, l'octasaccharide et le décasaccharide de l'acide hyaluronique. Ces trois oligosaccharides possèdent respectivement un degré de polymérisation (dp) de 6 (dp 6), 8 (dp 8) et 10 (dp 10). Les analyses sont effectuées sur ces oligosaccharides pour mettre en évidence le pouvoir de résolution de la technique d'analyse par nanopore pour caractériser et différencier deux oligosaccharides de même nature mais de taille différente. Ces oligosaccharides ont été obtenus au laboratoire après digestion enzymatique de l'acide hyaluronique puis purification par colonne chromatographique. Chaque oligosaccharide a ensuite été caractérisé par spectrométrie de masse MALDI-TOF, avant d'être analysé par nanopore. La [Figure 73](#) ci-dessous montre les spectres de ces oligosaccharides. Chacun d'eux est pratiquement pur, les spectres MALDI ne présentant que le pic de l'oligosaccharide analysé, mis à part les pics à  $m/z$  951.13, 1330.00 et 1708.85 qui correspondent à de très faibles traces en solution de dp 5, 7 et 9 correspondant à des molécules auxquelles il manque un résidu hexosamine (HexA).

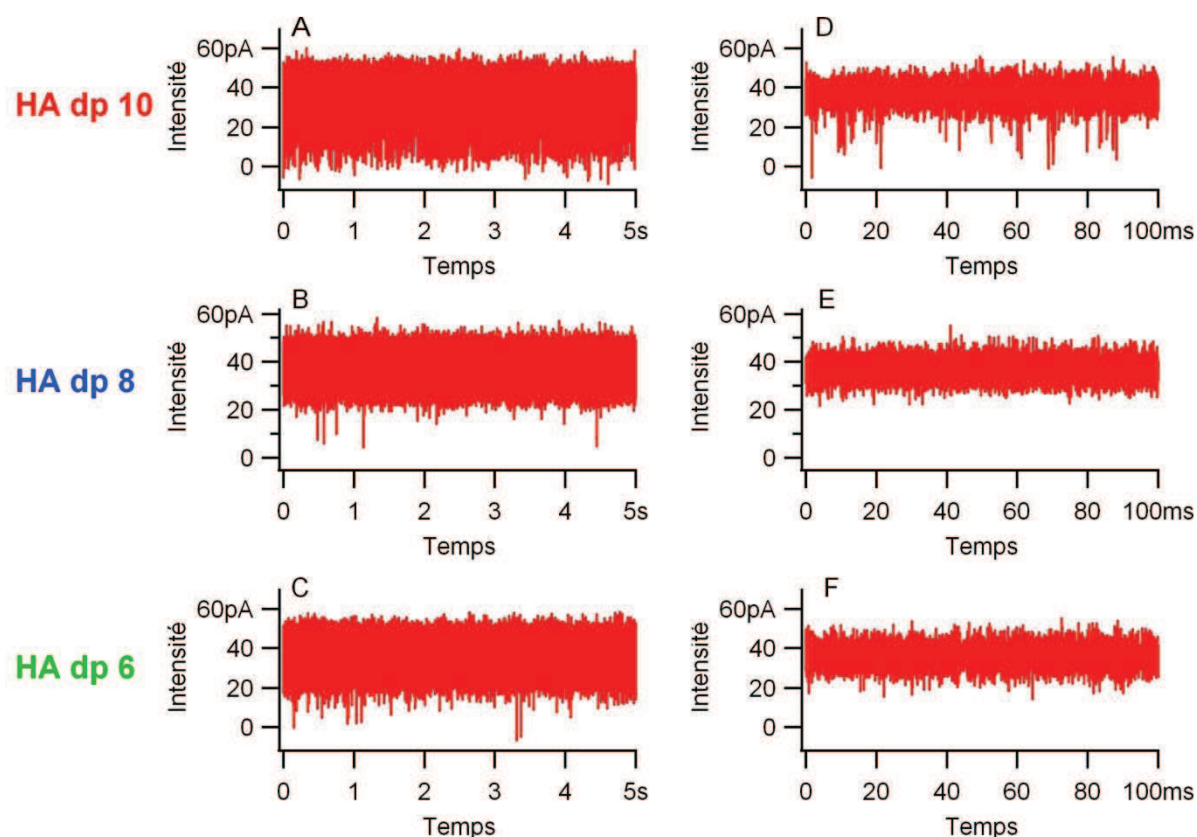






**Figure 73 :** Spectres de masse MALDI-TOF des (A) hexa-, (B) octa- et (C) décasaccharides de l'acide hyaluronique, avec en dessous un zoom autour de la masse molaire de l'oligosaccharide. Les spectres ont été obtenus en mode réflectron, en polarité négative. La matrice utilisée est HABA/TMG<sub>2</sub> ajoutée au ratio 1/1 avec l'analyte. La tension d'accélération est de 20 kV et le pourcentage de grille est de 70%. Le délai d'extraction est de 300 nsec.

Les différentes molécules sont ajoutées dans le compartiment *cis* de la cuve utilisées dans les expériences de détection par nanopore à la concentration de 1 mM dans 1 mL de solution tampon KCl 1 M, HEPES 5 mM, pH 7,5. Le potentiel transmembranaire appliqué est de 70 mV associé à un courant à travers l'aérolysine de  $32 \pm 4$  pA en l'absence d'oligosaccharides. Un exemple de trace pour chacun des oligosaccharides étudiés, avec un zoom sur une plus courte durée, est montré ci-dessous. On voit sur la [Figure 74](#) que les événements correspondant au décasaccharide (dp 10) sont facilement détectables. Le signal des octa- et hexasaccharides est plus difficile à analyser. Les événements sortent mal du bruit.

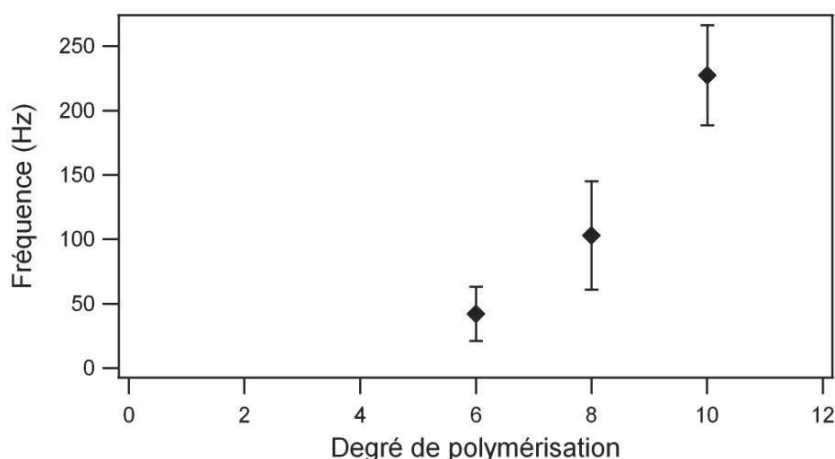


**Figure 74 :** Exemples de traces électriques des (A et D) déca-, (B et E) octa- et (C et F) hexasaccharide de l'acide hyaluronique dans une solution tampon KCl 1 M, 5 mM HEPES, pH 7,5 à travers un nanopore d'aérollysine, à une tension de 70 mV.

Nous avons néanmoins obtenu des résultats quantitatifs. Les différents oligosaccharides se distinguent par leur fréquence et leur durée de translocation.

### Fréquences de translocation

La fréquence de passage des oligosaccharides étudiés croît avec le degré de polymérisation. Cependant, ce comportement est *a priori* inattendu, en effet la mobilité électrophorétique de polyélectrolytes en solution dépend peu de leur degré de polymérisation. Il arrive aussi que la hauteur de la barrière de potentiel d'origine entropique à l'entrée d'un pore augmente avec la taille des molécules [27]. Nous faisons l'hypothèse que nos observations sont dues à un biais expérimental. Les petites molécules passent parfois trop vite pour être détectées dans notre fenêtre de résolution temporelle (rappelons que notre détection électrique ne mesure correctement, sans déformation, que les événements dont la durée est supérieure à 40  $\mu$ s) [28, 29]. C'est un problème souvent rencontré dans l'analyse des protéines par nanopore [29, 30].



**Figure 75 :** Fréquences de translocation des oligosaccharides d'acide hyaluronique en fonction du degré de polymérisation dans une solution tampon HEPES 5 mM, KCl 1 M, pH 7,5,  $\Delta V = 70$  mV.

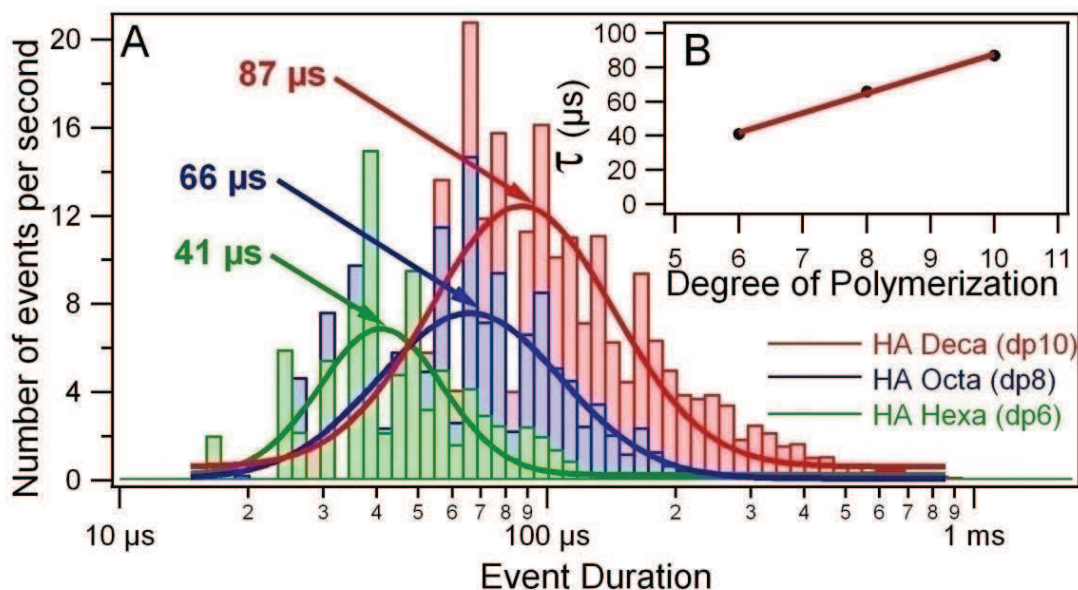
### *Durées de translocation*

Nous nous sommes principalement intéressés aux histogrammes des durées d'événements de chacun des oligosaccharides. L'aire différente de ces histogrammes (mesurée pour des nombres de molécules équivalentes) montre directement que le nombre de blocages détectés est différent pour les différentes molécules. Il nous a été possible de mesurer des temps de translocation pour l'hexa- et l'octasaccharide car une certaine proportion des événements reste détectable et analysable. Les histogrammes de distribution des durées de blocage sont représentés sur la [Figure 76, A](#). Nous mesurons des temps de translocation de  $44 \pm 5 \mu s$  pour l'hexa-,  $68 \pm 3 \mu s$  pour l'octa- et  $90 \pm 3 \mu s$  pour le décasaccharide de l'acide hyaluronique. Ces données montrent une augmentation linéaire ([Figure 76, B](#)), avec le degré de polymérisation des molécules, en accord avec les précédents résultats décrits dans la littérature sur les oligosaccharides de dextrane ou de maltose [11] ou les molécules de poly(éthylène glycol) [9, 10].

La relation suivante :

$$\tau \approx 11,5 \pm 0,29 \times DP - 27,33 \pm 2,36$$

décrit bien nos résultats, avec  $\tau$  en microseconde et DP le degré de polymérisation de la molécule étudiée.



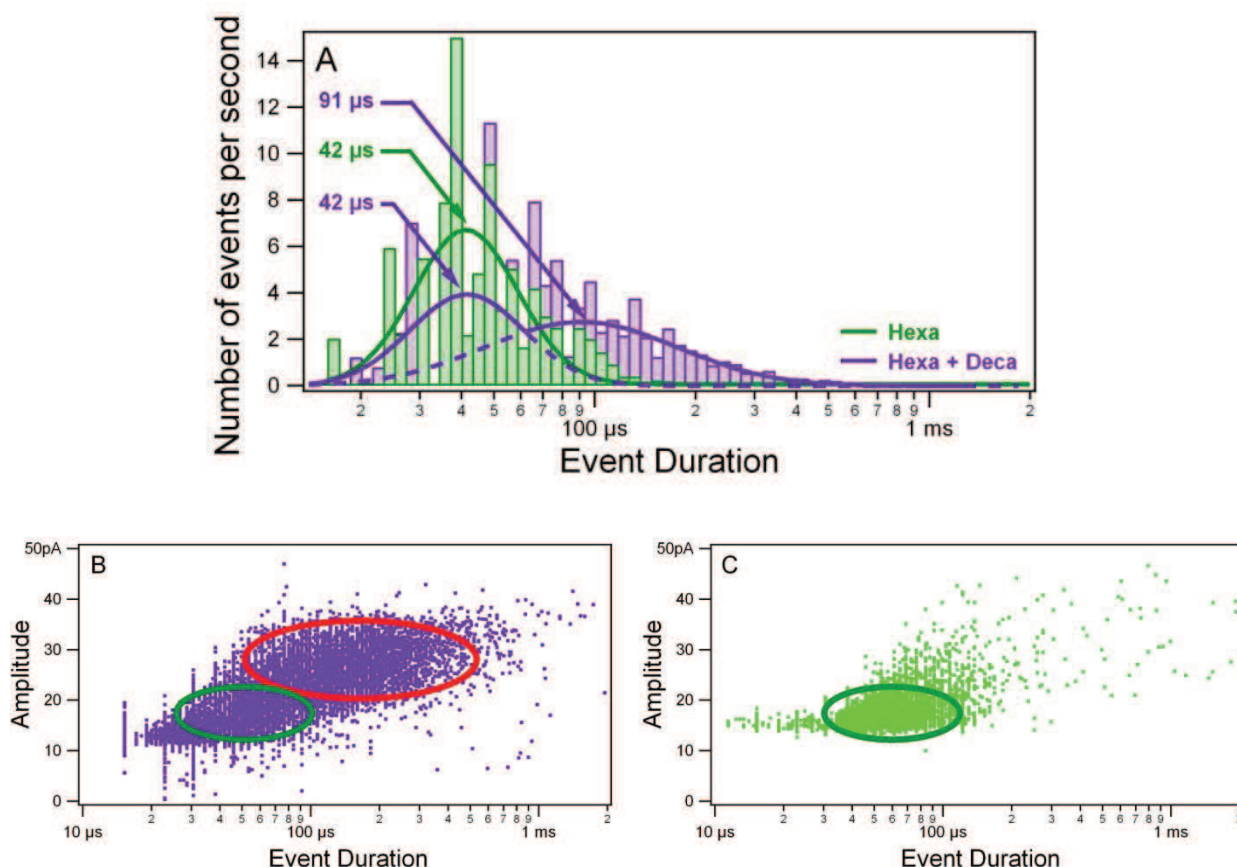
**Figure 76 :** (A) Superposition des histogrammes des durées d'événements correspondant à l'hexa- (en vert), octa- (en bleu) et décasaccharide (en rouge) de l'acide hyaluronique. (B) Evolution du temps de translocation le plus probable à travers un pore d'aérolysine, en fonction du degré de polymérisation de l'acide hyaluronique. Expériences faites dans KCl 1 M, 5 mM HEPES, pH 7,5.  $\Delta V = 70$  mV. [12]

Les trois oligosaccharides, bien que différents d'une seule unité disaccharidique, peuvent être correctement différenciés les uns des autres. Nous avons voulu tenter ensuite de distinguer deux molécules différentes, cette fois mélangées en solution.

#### II.4.2. Caractérisation et analyse de mélanges d'oligosaccharides

Un mélange constitué de chacun des oligosaccharides de dp 6 et de dp 10 a été ajouté dans le compartiment *cis* à la concentration de 0,5 mM chacun, dans une solution d'1 mL de KCl 1 M, HEPES 5 mM, à pH 7,5.

L'histogramme des durées d'événements obtenues avec le mélange a été superposé à celui de l'hexasaccharide seul (Figure 77, A). L'histogramme correspondant au dp 6 seul (en vert sur la Figure 77, A, introduit à 1 M en solution) est centré autour de 42 μs tandis que celui du mélange dp 6 + dp 10 (en violet sur la Figure 77, A) est décalé vers des durées d'événements plus longues. L'histogramme des durées d'événements du mélange peut être décomposé en une somme de deux gaussiennes, chacune correspondant aux histogrammes obtenus avec des solutions pures d'hexa- et de décasaccharide de l'acide hyaluronique : on mesure une durée de  $44 \pm 5$  μs pour la population correspondant au dp 6 et une durée de  $90 \pm 3$  μs pour la population correspondant au dp 10.



**Figure 77 :** Distribution des temps de passage de l'hexa- (dp 6) et du décasaccharide (dp 10) de l'acide hyaluronique mélangés dans une solution tampon HEPES 5 mM, KCl 1 M, pH 7,5.  $\Delta V = 70$  mV . (A) Histogramme des durées d'événement du dp 6 seul (en vert, 1 mM) et du mélange dp 6 + dp 10 (en violet, 0,5 mM chacun). (B) et (C) Nuage de points du dp 6 seul (C) et du mélange dp 6 + dp 10 (B). [12]

Une seconde représentation des événements sous forme de nuage de points de l'amplitude de blocage de chaque événement en fonction de sa durée (Figure 77, B et C), montre également deux populations différentes. Sur la Figure 77, C, l'hexasaccharide seul est caractérisé par une population d'événements centrée vers des temps courts et des amplitudes de blocage du courant comprises autour de  $18 \pm 3$  pA. On retrouve cette même population sur le nuage de point du mélange d'oligosaccharides (cerclée en vert sur la Figure 77, B) mais également une autre population (cerclée en rouge sur la Figure 77, B) centrée autour de temps de translocation plus longs et avec des amplitudes de blocage du courant plus importantes ( $30 \pm 5$  pA). Cette seconde population est attribuée aux événements de translocation du décasaccharide de l'acide hyaluronique.

Les expériences permettent donc de distinguer les deux oligosaccharides mélangés en solution. Les chaînes les plus longues ont des durées de blocage plus longues que les chaînes courtes, de plus, on observe des niveaux de blocage différents sur le nuage de point, indiquant des configurations différentes des chaînes présentes en solution.

## II.5. Détection MS de la translocation

L'une des questions fréquemment posées dans le domaine des nanopores concerne la réalité de la translocation des macromolécules à travers le pore. Les molécules traversent-elles complètement le pore pour aller du compartiment *cis* vers le compartiment *trans* ? Rentrent-elles dans le pore mais sans parvenir à la traverser, pour finalement ressortir dans le compartiment d'où elles viennent ? En étudiant la fréquence ou les durées des événements en fonction de la tension, on peut être amené à penser que les molécules traversent bien le pore [31]. Mais il existe très peu de preuves directes. L'équipe de Kasianowicz *et al.* a démontré dans son article pionnier de 1996 [4] la présence d'ADN dans le compartiment *trans* en amplifiant l'ADN par PCR.

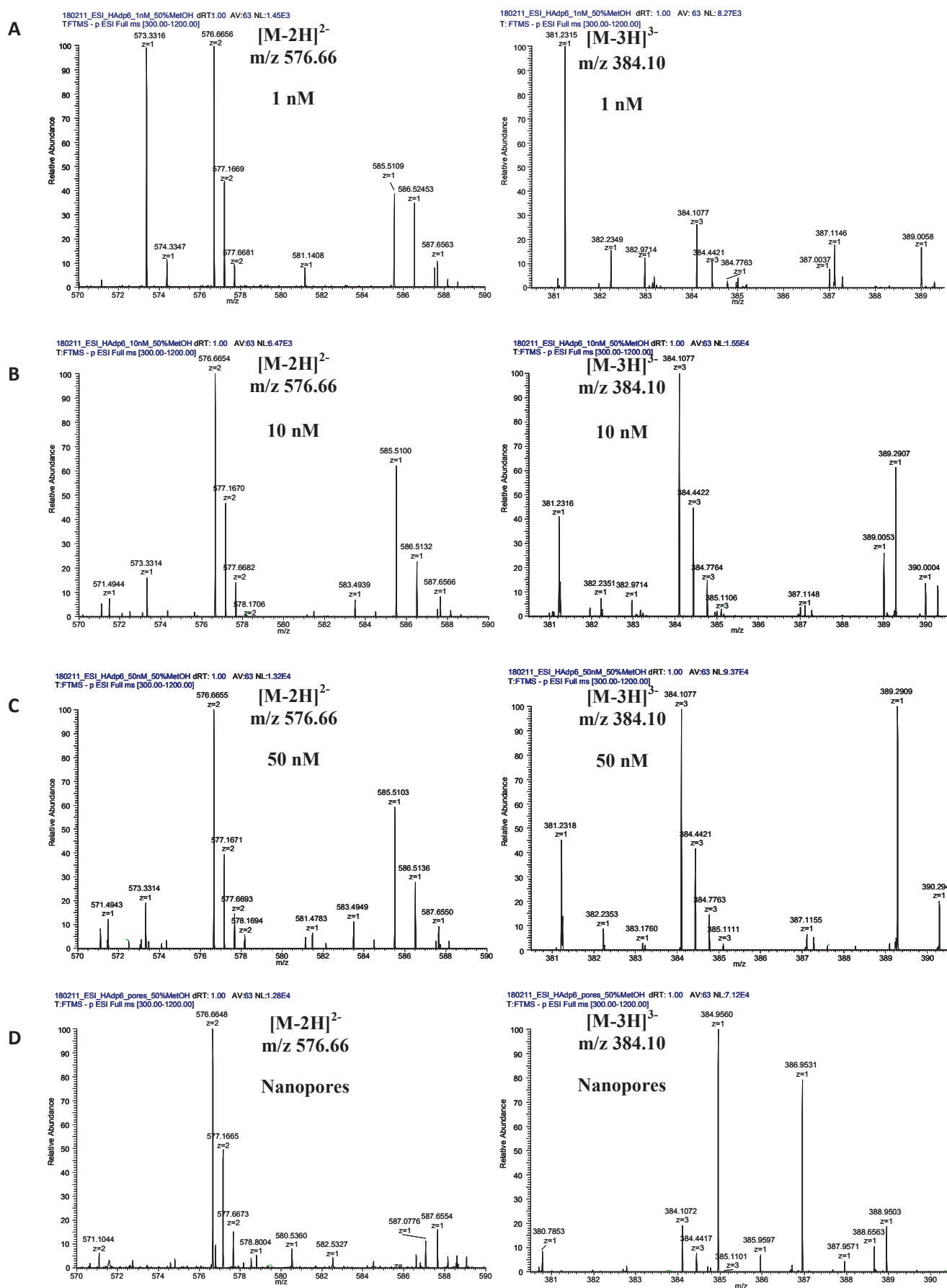
De même, M. Gershow et J. A. Golovchenko [32] ont montré que les molécules d'ADN traversent bien complètement le pore en essayant de "rattraper" les molécules ayant entraîné un pic de translocation. Lorsqu'une molécule traverse le pore, une baisse de courant en résulte. Quelques millisecondes après cette baisse de courant, l'inversion du potentiel permet de recapturer cette même molécule de l'autre côté du pore pour lui faire traverser à nouveau le pore vers le compartiment initial. Cette méthode permet également d'analyser à plusieurs reprises la même molécule et ainsi d'avoir plus de précisions quant à ses propriétés. Cela a ainsi permis de piéger la même molécule d'ADN en lui faisant faire 12 traversées consécutives du pore sur une période de 250 ms.

Nous avons cherché à prouver directement par spectrométrie de masse que les oligosaccharides ont traversé le pore d'aérolysine depuis le compartiment *cis*, pour en ressortir dans le compartiment *trans*. C'est la première fois que cette approche par spectrométrie de masse était tentée.

Pour ce faire, nous avons utilisé un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap possédant une source électrospray (ESI-MS) dont la limite de détection est de l'ordre de la femtomole, correspondant à  $10^7$  molécules de dp 6. Sur la durée d'une seule expérience de translocation (5 minutes), nous estimons à  $60 \cdot 10^3$  le nombre de molécules ayant traversé le pore, soit environ  $10^{-3}$  fmoles, bien en dessous de la limite de détection. C'est pourquoi nous avons rassemblé les solutions du compartiment *trans* de sept différentes expériences de translocation de molécules d'hexasaccharide de l'acide hyaluronique. Les expériences de translocations ont été conduites pendant plusieurs heures, parfois à des tensions plus importantes, pour augmenter le nombre de molécules ayant traversé le pore. Ces échantillons ont ensuite été dialysés pour éliminer la présence des sels, puis lyophilisés et repris dans un volume de 100  $\mu$ L.

L'analyse des spectres de masse par électrospray, en mode d'ionisation négative, de molécules d'hexasaccharide purifiées révèle la présence d'ions caractéristiques de l'hexasaccharide à  $m/z$  384,107 et 576,665 (Figure 78, A, B et C), correspondant aux espèces di- et trichargées de l'hexasaccharide de l'acide hyaluronique. On retrouve ces mêmes ions caractéristiques dans les spectres correspondant aux solutions du compartiment *trans* (Figure 78, D), montrant que des molécules d'hexasaccharide sont bien passées à travers le canal d'aérolysine. Pour appuyer nos résultats, l'identification des pics correspondant aux molécules de l'hexasaccharide de l'acide hyaluronique, dichargés et trichargés, a par la suite été confirmée par fragmentation MS<sup>n</sup>, donnant des pics caractéristiques de l'hexasaccharide.



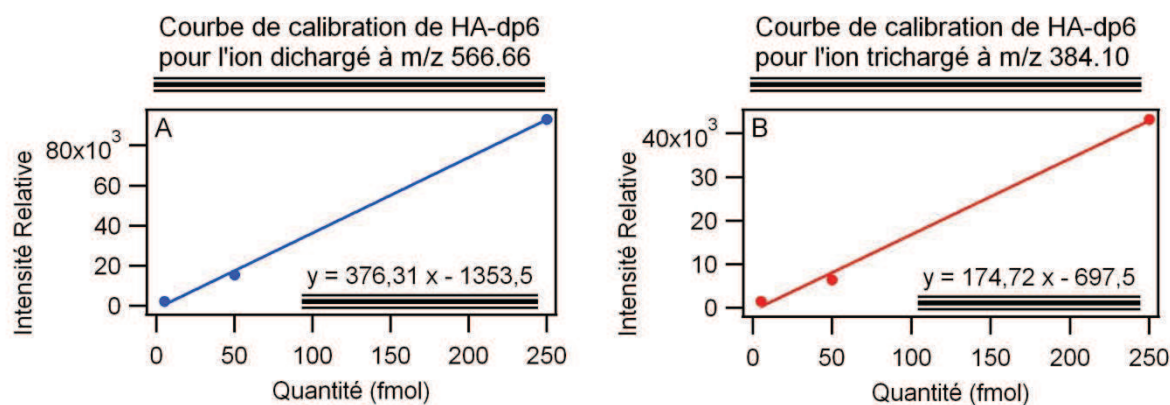


**Figure 78** : Spectres de masse de différentes solutions d'hexasaccharide de l'acide hyaluronique. Des zooms ont été faits autour de l'ion dichargé (à gauche) ou de l'ion trichargé (à droite). Les spectres (A), (B) et (C) correspondent à des solutions standards d'hexasaccharide à différentes concentrations tandis que les spectres (D) correspondent aux solutions des compartiments *trans* récupérées après les expériences.

Pour vérifier que les molécules détectées ne résultent pas d'un transfert à travers la membrane et non à travers le pore, ou encore d'une contamination due à la cassure de la membrane au moment du prélèvement, nous avons effectué un test avec une membrane dépourvue d'aérollysine. Plusieurs expériences ont été conduites, dans les mêmes conditions que précédemment. La membrane étant imperméable, elle rend le passage des molécules du compartiment *cis* vers le compartiment *trans* théoriquement impossible. Les contenus des différents compartiments *trans* ont, de la même façon que précédemment, été rassemblés, dialysés et lyophilisés, puis analysés par MS. Aucun ion caractéristique de l'hexasaccharide n'a pu être décelé, prouvant ainsi que les molécules retrouvées dans le compartiment *trans* de l'expérience précédente, étaient bien le résultat de leur translocation à travers le pore.

Les résultats de fragmentation MS<sup>n</sup> mènent aux mêmes conclusions. Les ions fragments des ions dichargés (Annexe, Figure 128) et trichargés (Annexe, Figure 129) sont exactement les mêmes que l'on regarde les spectres de l'hexasaccharide standard ou de l'échantillon contenant les molécules ayant traversé le pore. Cela prouve que ces pics correspondent bien à des molécules d'hexasaccharide de l'acide hyaluronique et donc que ces molécules ont bien traversé le pore d'aérollysine.

Enfin, nous avons voulu estimer le nombre de molécules d'hexasaccharide de l'acide hyaluronique détecté par spectrométrie de masse. Pour cela, le signal MS de trois solutions de concentrations connues (1, 10 et 50 nM) a été intégré pendant 1 minute de détection. La droite d'étalonnage (Figure 79, A et B) donnant l'intensité relative en fonction de la quantité d'hexasaccharide a ainsi pu être tracée. A l'aide de cette droite et de l'intensité relative des pics caractéristiques de l'hexasaccharide, dans le mélange provenant du compartiment *trans*, nous obtenons une mesure de leur concentration. Un total d'environ 200 fmoles de molécules ayant traversé le pore a été estimé.



**Figure 79 : Droites de calibration donnant l'intensité relative en fonction de la quantité d'hexasaccharide pour l'ion (A) dichargé ou (B) trichargé.**

Les différentes expériences de translocation des oligosaccharides de l'acide hyaluronique ont été faites à une concentration de 1 mM. A cette concentration, la fréquence de translocation estimée d'après nos précédentes expériences avec le décasaccharide est d'environ 200 Hz, soit 200 macromolécules traversant le pore par seconde. En cumulant toutes ces expériences, et en sommant toutes les macromolécules ayant traversé pendant ce temps, on ne retrouve qu'une quantité de molécules d'environ 0,3 fmol. Cela signifie donc que les événements que nous détectons et analysons ne représentent qu'une

petite fraction des molécules traversant le pore. Cela est cohérent avec les remarques faites précédemment (Partie II.4.1) sur la résolution des expériences de détection électrique.

Ainsi, la technique d'analyse par nanopore, qui jusqu'à présent n'avait été utilisée que pour des analyses d'acides nucléiques, de protéines ou de polymère et rarement pour des polysaccharides, a permis une bonne discrimination d'oligosaccharides d'acide hyaluronique différents d'une seule unité disaccharidique.

Nous avons ensuite voulu étudier la translocation de l'héparine, un glycosaminoglycane sulfaté, de structure bien plus complexe que celle de l'acide hyaluronique.

## II.6. Translocation d'oligosaccharides d'héparine à travers l'aérollysine

L'héparine fait partie de la famille des glycosaminoglycanes comme l'acide hyaluronique mais possède en plus des groupes sulfate. Dotée de fortes propriétés anticoagulantes, l'héparine est fréquemment utilisée dans le domaine médical pour son action sur la thrombose. Elle se lie entre autres à l'anti-thrombine via une séquence particulière (décrite dans la partie I.1.1). L'héparine est constituée d'un acide glucuronique (GlcA) ou un acide L-iduronique (IdoA) liés à une glucosamine (GlcN) par une liaison  $\beta(1\rightarrow4)$  et  $\alpha(1\rightarrow4)$ , respectivement, formant ainsi son disaccharide constitutif. Les différents disaccharides sont reliés entre eux par des liaisons  $\alpha(1\rightarrow4)$  [14, 15].

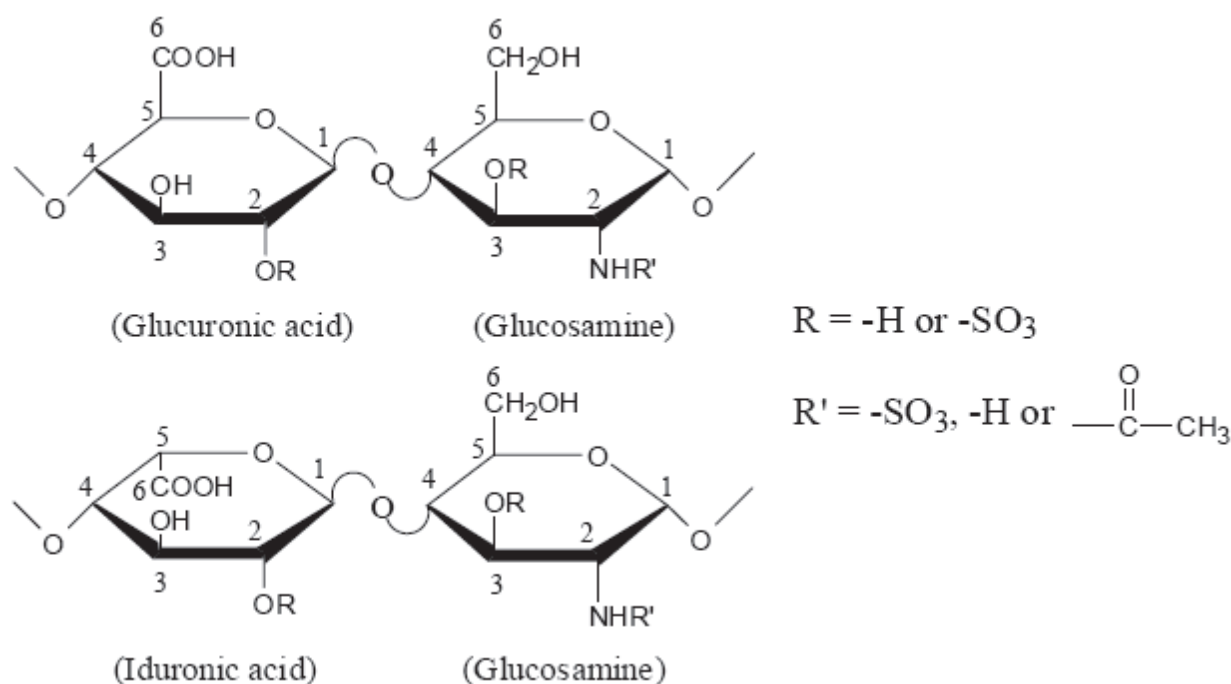
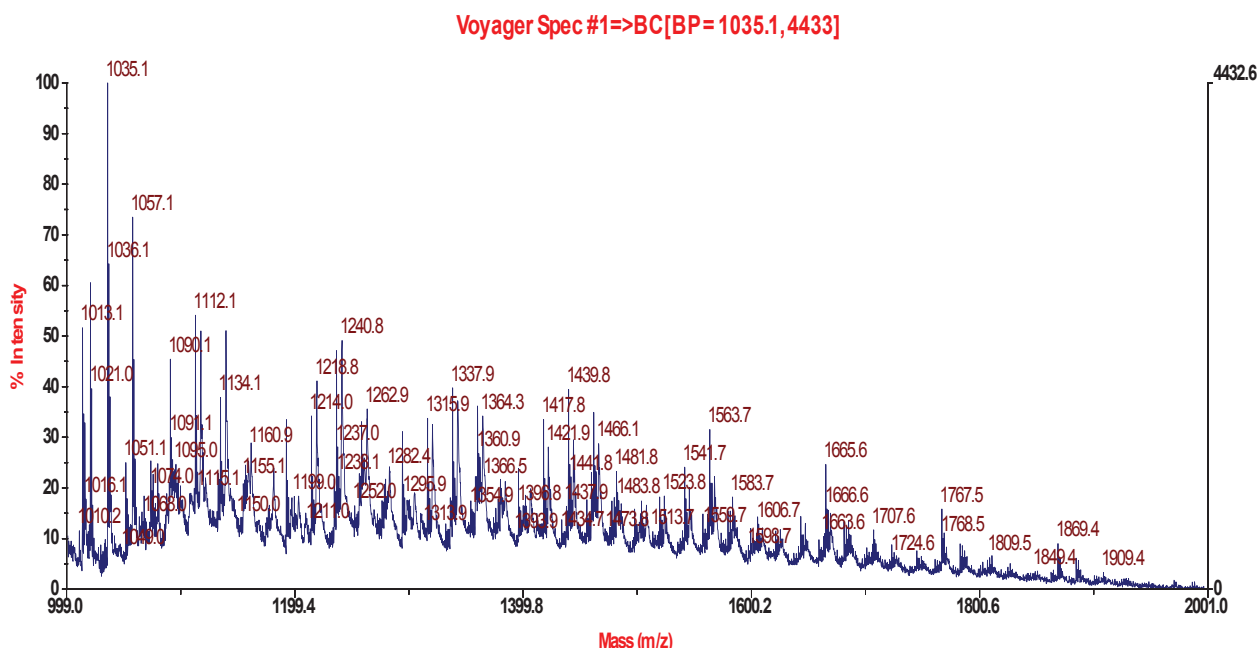


Figure 80 : Disaccharide constitutif de l'héparine.

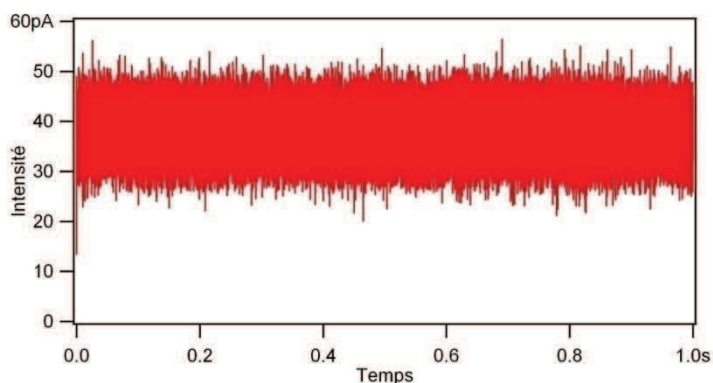
La structure de l'héparine étant plus complexe que celle de l'acide d'hyaluronique, on s'attend à observer des événements de translocation différents. La démarche utilisée ici est semblable à celle utilisée précédemment. Nous commençons par étudier des oligomères de degrés de polymérisation 6, 10 et 16, dont la structure du disaccharide constitutif est représentée sur la [Figure 80](#) et dont la caractérisation en spectrométrie de masse MALDI-TOF est représentée sur la [Figure 81](#). La présence de nombreux pics sur le spectre MALDI est due à l'hétérogénéité des oligosaccharides d'héparine, présentant chacun différents nombres de groupements sulfate.



**Figure 81 :** Spectre MALDI de l'hexasaccharide d'héparine montrant la diversité des structures de cet oligosaccharide en solution. Les spectres ont été obtenus en mode réflectron, en polarité négative. La matrice utilisée est HABA/TMG<sub>2</sub> ajoutée au ratio 1/1 avec l'analyte. La tension d'accélération est de 20 kV et le pourcentage de grille est de 70%. Le délai d'extraction est de 300 nsec.

Etant donné la faible quantité d'oligosaccharides de l'héparine dont nous avons disposé, nous avons utilisé des concentrations de 25  $\mu$ M, suffisantes pour être détectées par notre technique de détection électrique (Cf. partie [II.3.3](#)).

Les premières expériences n'ayant donné lieu à aucune observation de blocage quel que soit le degré d'oligomérisation, la concentration en oligosaccharides a été doublée pour vérifier si l'absence d'événement n'était pas uniquement due à une trop faible concentration. Aucun événement n'a été détecté même à des concentrations de 50  $\mu$ M (Cf. [Figure 82](#)), et ce quelle que soit la tension appliquée jusqu'à 100 mV.



**Figure 82 :** Trace correspondant à un essai de translocation d'un oligosaccharide d'héparine DP 16, dans une solution tampon HEPES 5 mM, pH 7,5, KCl 1M, à une tension de 70 mV, à travers un pore d'aérollysine.

Cette absence de détection est surprenante et décevante. Elle pourrait être due au grand encombrement des molécules. Le rayon hydrodynamique des oligosaccharides d'héparine est estimé à  $0,43 \pm 0,02$  nm soit un diamètre d'environ 0,86 nm [33], qui, ajouté à l'épaisseur du nuage de contre-ions, est peut-être supérieur à celui du pore d'aérollysine, dont le diamètre interne est estimé entre 1 et 1,7 nm.

Nous avons alors essayé de diminuer le nuage de contre-ions formé autour des molécules à analyser en augmentant la concentration saline jusqu'à une concentration de 4,5 M en KCl (à la limite de solubilité du KCl) [34]. L'épaisseur de ce nuage de contre-ions est de l'ordre de la longueur de Debye lorsque les molécules sont en solution, ce qui augmente le diamètre apparent total des oligosaccharides d'héparine [35].

La longueur de Debye est fonction de la concentration de l'électrolyte en solution, sa valeur est donnée par l'équation :

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_d k_B T}{2e^2 c_s}}$$

Avec  $\lambda_D$  la longueur de Debye en nm,  $\epsilon_d$  la permittivité diélectrique du solvant,  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température en Kelvins,  $e$  la charge d'un électron et  $c_s$  la concentration de l'électrolyte en solution exprimée en ions/m<sup>3</sup>. Dans une solution aqueuse de sel monovalent (KCl par exemple) à température ambiante, l'expression de la longueur de Debye peut être simplifiée:

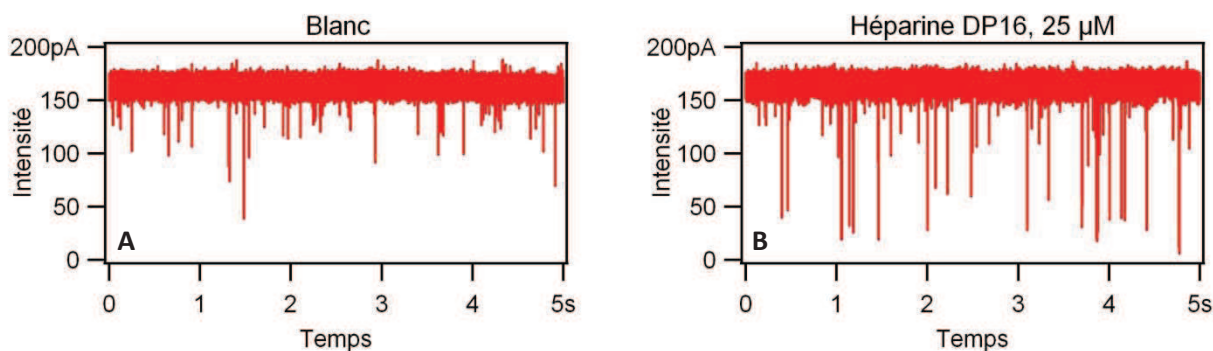
$$\lambda_D \approx \frac{0,3}{\sqrt{c_s}}$$

Avec  $\lambda_D$  la longueur de Debye en nm,  $c_s$  la concentration de l'électrolyte en solution exprimée en mol/L.

Nous avons augmenté la concentration en KCl pour réduire au maximum la taille du nuage de contre-ions. A 1 M en KCl la longueur de Debye est égale à 0,3 nm, ce qui conduirait à une augmentation du diamètre apparent des chaînes en solution de 0,6 nm. Cela donne un diamètre total de 1,46 nm, ce qui peut être supérieur aux dimensions du pore d'aérollysine. A 4,5 M en KCl la longueur de Debye ne vaut plus que 0,14 nm, ce qui conduit à un diamètre total d'environ 1,18 nm, ce qui pourrait éventuellement permettre la translocation à travers l'aérollysine.

Nous observons effectivement des blocages à 4,5 M de KCl en présence d'héparine, mais leur analyse a été rendue difficile par l'existence de blocages parasites observés même en absence d'héparine (Figure 83). L'ajout d'héparine augmente globalement la fréquence des événements de blocage (Figure 83, B), et une fraction des pics présentent un taux de blocage plus grand. Cette fraction est attribuée aux oligosaccharides ajoutés.

Dans l'état actuel de nos expériences, les oligosaccharides d'héparine ne sont donc détectables par la technique des nanopores dans le cas de l'aérolysine qu'à haute force ionique.



**Figure 83 :** Expériences menées dans une solution tampon HEPES 5 mM, KCl 4,5 M, avec une tension de 70 mV. (A) Trace obtenue avant l'ajout de molécule dans le compartiment *cis*. (B) Trace obtenue après ajout de 25 µM d'héparine DP 16.

La présence des groupements sulfate semble empêcher le passage de ces macromolécules à travers l'aérolysine. Une première explication, déjà évoquée, est liée à la taille des molécules. Il est possible également que la répulsion électrostatique entre l'héparine fortement chargée négativement et le canal d'aérolysine soit en cause. Il se pourrait aussi que les liaisons de l'héparine moins flexibles que celles de l'acide hyaluronique, ne permettent pas à la molécule de se réarranger pour traverser le pore.

Dans ces conditions il nous a semblé intéressant d'utiliser un autre nanopore protéique, l' $\alpha$ -hémolysine, dont le diamètre interne est légèrement plus élevé que celui de l'aérolysine.

## II.7. Translocation de différents polysaccharides à travers l' $\alpha$ -hémolysine

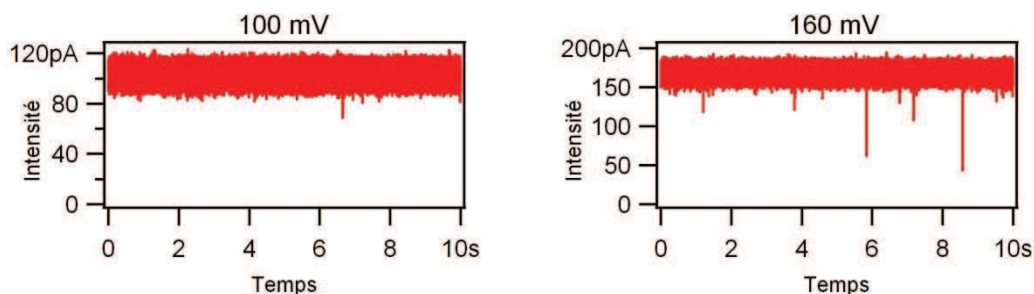
Pour tenter d'observer des passages de l'héparine, nous allons utiliser un nanopore plus large, l' $\alpha$ -hémolysine. Une autre différence entre l' $\alpha$ -hémolysine et l'aérolysine concerne leur charge. Rappelons que l'aérolysine possède une charge globale négative très élevée (estimée à -52 e à pH 7,5) tandis que la charge globale de l' $\alpha$ -hémolysine est légèrement positive (+7 e à pH 7,5). Ces différences de charge peuvent entraîner des différences d'interactions avec les molécules analysées. Pour comparer ces interactions, nous étudions aussi le passage d'oligosaccharides d'acide hyaluronique à travers l' $\alpha$ -hémolysine.



### II.7.1. Caractérisation et analyse d'oligosaccharides d'acide hyaluronique monodisperses

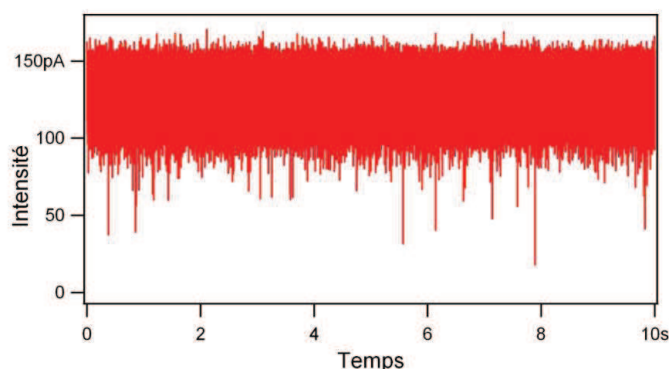
Les premières expériences de translocation d'oligosaccharides (dp 6, dp 8 et dp 10) de l'acide hyaluronique à travers l'hémolysine ont été réalisées à des concentrations de 100  $\mu$ M. A notre grande surprise, aucun événement n'a été détecté. Nous avons tenté d'augmenter la tension appliquée entre 30 et 200 mV, nous avons aussi augmenté la force ionique (jusqu'à 4,5 M) et la concentration en oligosaccharide (d'un facteur 3 à 5). Mais rien ne s'est produit.

Les oligosaccharides étant suffisamment petits pour passer à travers l' $\alpha$ -hémolysine, la seule explication possible est que le passage des molécules est trop rapide pour être observé. Ce phénomène semble avoir déjà été observé par Merstorf *et al.* [6] dans le cas de l'étude d'une protéine, la Maltose Binding Protein (MBP). Après avoir analysé les enregistrements, on remarque quelques événements apparaissant malgré tout mais de façon trop rare pour pouvoir effectuer une analyse statistique.



**Figure 84 :** Traces correspondant à un essai de translocation du décacaccharide de l'acide hyaluronique (100  $\mu$ M) à travers un pore d' $\alpha$ -hémolysine, dans une solution tampon HEPES 5 mM, KCl 1 M.

Ces expériences ont été poursuivies en collaboration avec Jérôme Mathé sur un autre appareil possédant une meilleure résolution temporelle que le nôtre et possédant une régulation de température. Celui-ci opère à des fréquences d'acquisition d'1 MHz, et des événements de l'ordre de la microseconde sont détectables. Nous avons alors refroidi la solution pour ralentir l'éventuel passage des molécules à travers l'hémolysine [19]. La température a été diminuée graduellement de 25  $^{\circ}$ C à 2  $^{\circ}$ C.



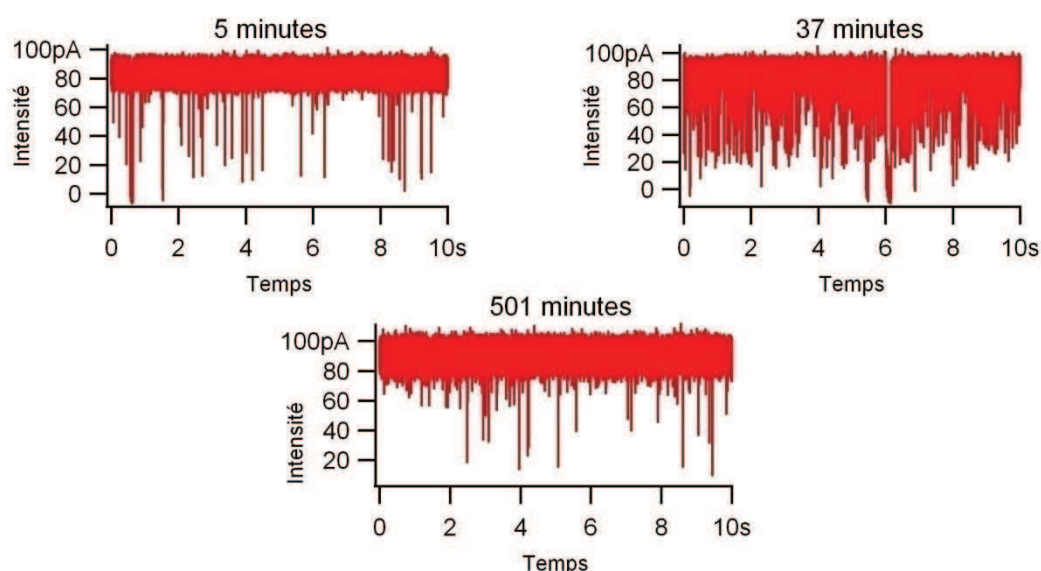
**Figure 85 :** Trace correspondant à l'analyse d'un décacaccharide de l'acide hyaluronique (100  $\mu$ M) à travers un pore d' $\alpha$ -hémolysine, dans une solution tampon HEPES 5 mM, KCl 1 M, avec une tension de 100 mV. T = 25  $^{\circ}$ C.

On observe alors l'existence de quelques événements de blocage (Figure 85). La largeur des blocages (comprise entre 5 et 10  $\mu$ s) paraît fixée par la résolution de l'appareil.

### II.7.2. Mélanges d'oligosaccharides de différentes tailles

Pour tester l'influence de la longueur de la chaîne d'acide hyaluronique sur les temps de passage, nous avons décidé d'utiliser un mélange naturel de plusieurs molécules de différentes tailles allant du dp 4 (756,4 g/mol) au polysaccharide natif complet ( $1,63 \cdot 10^6$  g/mol environ soit plus de 4000 disaccharides reliés les uns aux autres). Ce mélange de molécules est obtenu par dépolymérisation enzymatique de l'acide hyaluronique par la hyaluronidase. L'analyse de la réaction enzymatique par nanopore sera décrite plus en détail dans le [Chapitre III](#), nous voulons seulement montrer ici que des molécules d'acide hyaluronique suffisamment longues et suffisamment lentes sont détectables par passage à travers l' $\alpha$ -hémolysine.

Nous observons ([Figure 86](#)) plusieurs événements de passage dès le début de la réaction enzymatique (après quelques minutes), leur nombre augmente avec le temps jusqu'à un certain maximum à partir duquel il décroît. Cela est en accord avec l'existence d'une longueur seuil de détection. A la fin de la réaction ne restent que des petits oligosaccharides inobservables.



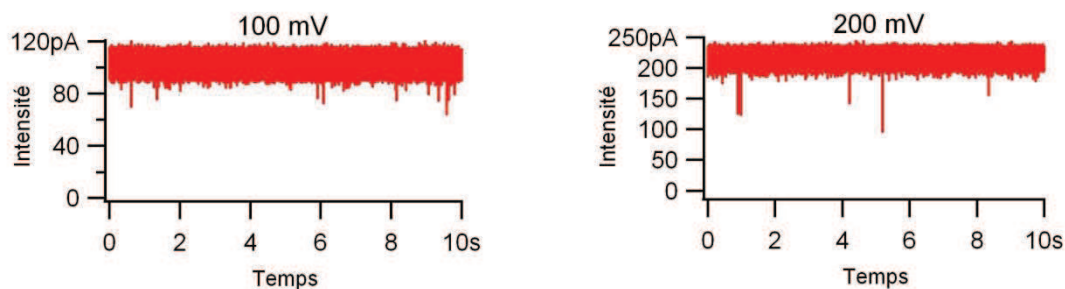
**Figure 86 :** Traces à différents temps de réaction enzymatique à travers un pore d' $\alpha$ -hémolysine.  $\Delta V = 100$  mV.

### II.7.3. Translocation d'oligosaccharides d'héparine

Ne parvenant pas à détecter le passage d'oligosaccharides courts d'acide hyaluronique, nous nous sommes tournés vers les oligosaccharides d'héparine. En effet, ces chaînes pourraient passer dans le pore d' $\alpha$ -hémolysine.

Les oligosaccharides de l'héparine étudiés sont les mêmes que ceux étudiés avec l'aérollysine (les dp 6, 10 et 16). Malheureusement, comme cela avait été le cas avec l'aérollysine, aucun événement de blocage

n'a été détecté dans nos conditions standards (HEPES 5 mM, KCl 1 M, pH 7,5), quelle que soit la tension appliquée. L'effet d'une augmentation de la force ionique (HEPES 5 mM, KCl 4,5 M, pH 7,5) a été également négatif.



**Figure 87 :** Traces à différentes tensions correspondant à l'analyse d'un dp 6 d'héparine (25 µM) à travers un pore d'α-hémolysine dans une solution tampon HEPES 5 mM, KCl 1 M, pH 7,5.

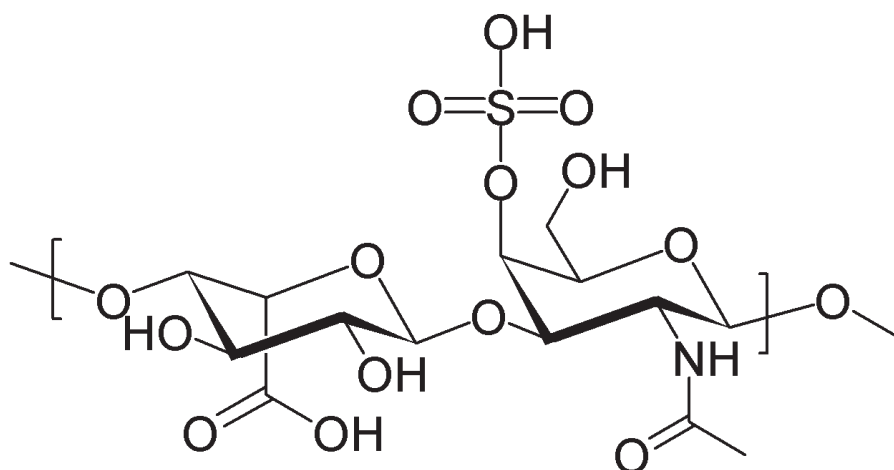
Le dp 2 IS (disaccharide trisulfaté) de l'héparine, plus petit que les trois autres oligosaccharides utilisés, a alors été utilisé mais le résultat a été le même. Aucun événement n'a pu être observé.

Pour déterminer l'origine de ces observations négatives, dues à trop grande taille des groupes sulfate, ou un passage trop rapide (donc inobservable) des molécules, nous avons étudié la translocation de deux autres oligosaccharides sulfatés : le dermatane sulfate, faisant également partie de la famille des glycosaminoglycanes, et le dextrane sulfate.

#### II.7.4. Caractérisation et vérification de la translocation d'oligosaccharides de dermatane sulfate

Le dermatane sulfate est sulfaté, comme l'héparine, mais possède une structure différente.

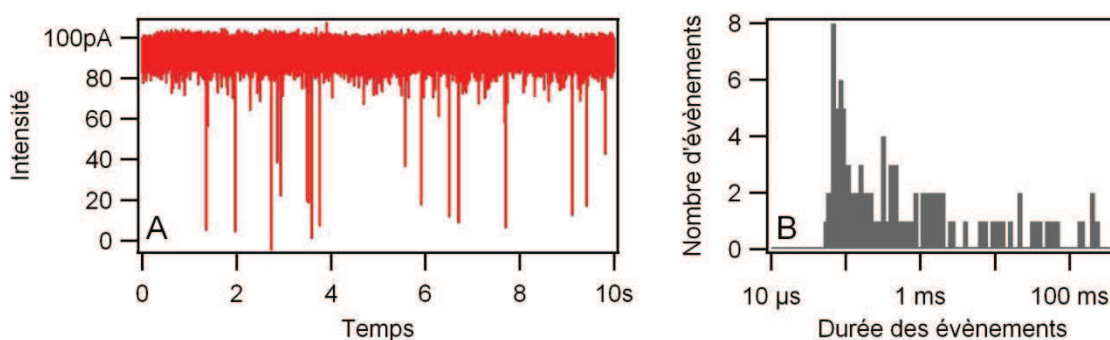
Ce polysaccharide est constitué de la répétition d'unités disaccharidiques, constituées d'une galactosamine N-acétylée (GalNAc) reliée par une liaison  $\beta(1\rightarrow3)$  à un acide iduronique (IdoA) [15, 36]. Ces unités disaccharidiques sont reliées les unes aux autres par des liaisons  $\beta(1\rightarrow4)$  contrairement à l'héparine pour laquelle la liaison glycosidique peut-être soit une liaison  $\beta(1\rightarrow4)$  (si le cycle uronique du disaccharide est un acide glucuronique) soit une liaison  $\alpha(1\rightarrow4)$  (si le cycle uronique du disaccharide est un acide iduronique) et où les liaisons reliant les unités disaccharidiques sont des liaisons  $\alpha(1\rightarrow4)$ . Cependant, tous les disaccharides ne sont pas les mêmes, le degré de sulfatation varie, une épimérisation peut avoir lieu sur le carbone 5 transformant l'acide iduronique en acide glucuronique (GlcA).



**Figure 88** : Structure chimique du dermatane sulfate. La molécule peut être sulfatée en position 2-O de l'acide iduronique, 4-O-sulfatée et/ou 6-O-sulfatée sur la galactosamine. Une épimérisation peut également avoir lieu sur le carbone 5 de l'acide iduronique.

Le dermatane sulfate utilisé a une masse molaire de 5150 g/mol (comportant cinq unités disaccharides, soit un décasaccharide). Les molécules ont été introduites en solution à la concentration de 100  $\mu$ M.

On observe des blocages de courant en présence de ce glycosaminoglycane sulfaté. La présence de groupements sulfate au sein d'un glycosaminoglycane n'empêche pas sa translocation à travers le pore. Le fait que nous ne voyions aucun événement de translocation des oligosaccharides d'héparine n'est donc pas dû uniquement à la présence des groupements sulfate mais provient peut-être d'une différence conformationnelle empêchant les molécules de se réorganiser ou de prendre une conformation plus linéaire pour traverser le pore [33].



**Figure 89** : (A) Trace montrant les événements de translocation du dermatane sulfate 5150 (100  $\mu$ M) à travers un pore d'aérolysine, dans une solution tampon HEPES 5 mM, KCl 1 M, pH 7,5.  $\Delta V = 100$  mV. (B) Histogramme des durées d'événements correspondants.

Cependant, à l'inverse des analyses d'oligosaccharides de l'acide hyaluronique pour lesquelles l'histogramme des durées d'événements pouvait être approximé par une gaussienne, il est difficile pour le dermatane sulfate d'attribuer un temps moyen de passage, les durées d'événements étant trop dispersées.

### II.7.5. Dextrane sulfate

Le dextrane sulfate est un autre polysaccharide sulfaté, mais celui-ci ne fait pas partie des glycosaminoglycanes. Il a été utilisé par l'équipe comme polyélectrolyte modèle [35, 37, 38]. Il s'agit d'un polysaccharide pouvant être linéaire ou branché, généralement utilisé en médecine pour réduire la viscosité sanguine. Ce polysaccharide est composé d'un enchaînement de molécules de glucose reliées par des liaisons  $\alpha(1\rightarrow6)$  (liaisons  $\alpha(1\rightarrow4)$  et  $\beta(1\rightarrow4)$  pour l'héparine et l'acide hyaluronique). Les chaînes branchées sont quant à elles reliées par des liaisons  $\alpha(1\rightarrow3)$  mais ces liaisons sont cependant très minoritaires (5% des liaisons totales). Concernant les groupements sulfates, il y en a en moyenne 2,3 par résidu. L'hétérogénéité des monomères provient donc uniquement de la répartition des groupements sulfate.

L'oligosaccharide étudié possède une masse molaire de 8000 g/mol (correspondant à un degré de polymérisation 16) et est totalement linéaire.

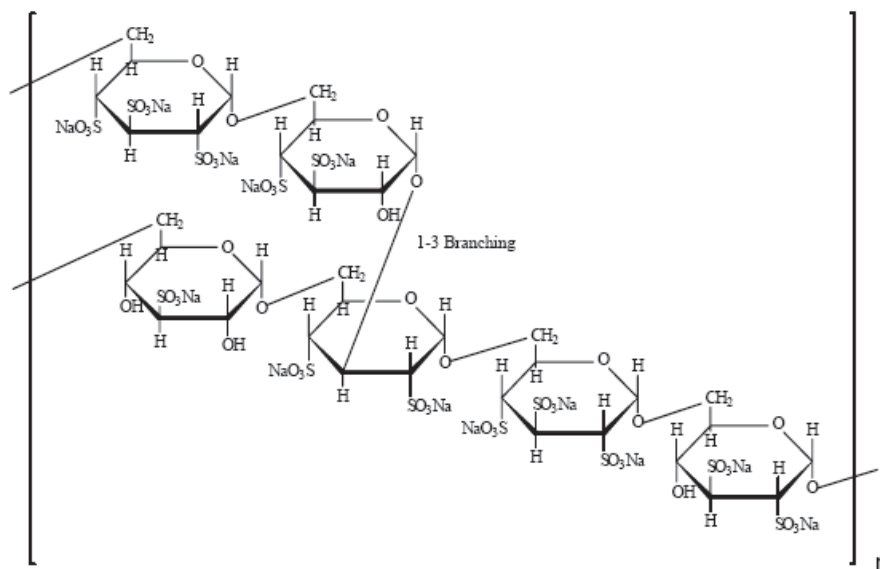
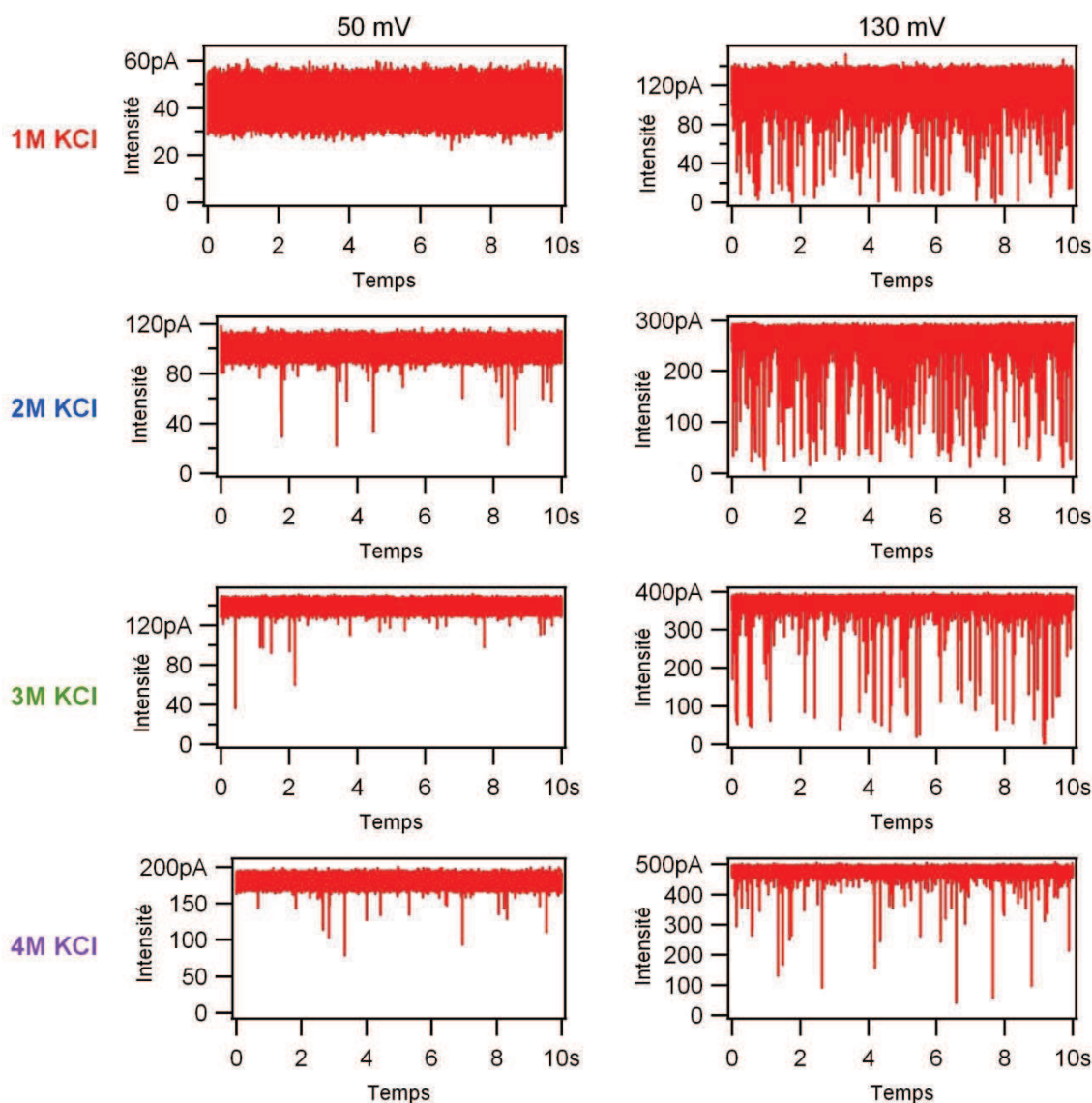


Figure 90 : Structure chimique du dextrane sulfate.

Les molécules sont ajoutées en solution de manière à obtenir une concentration de 100  $\mu\text{M}$ . Ci-dessous se trouvent des exemples de traces à différentes forces ioniques et à deux différentes tensions, 50 et 130 mV.

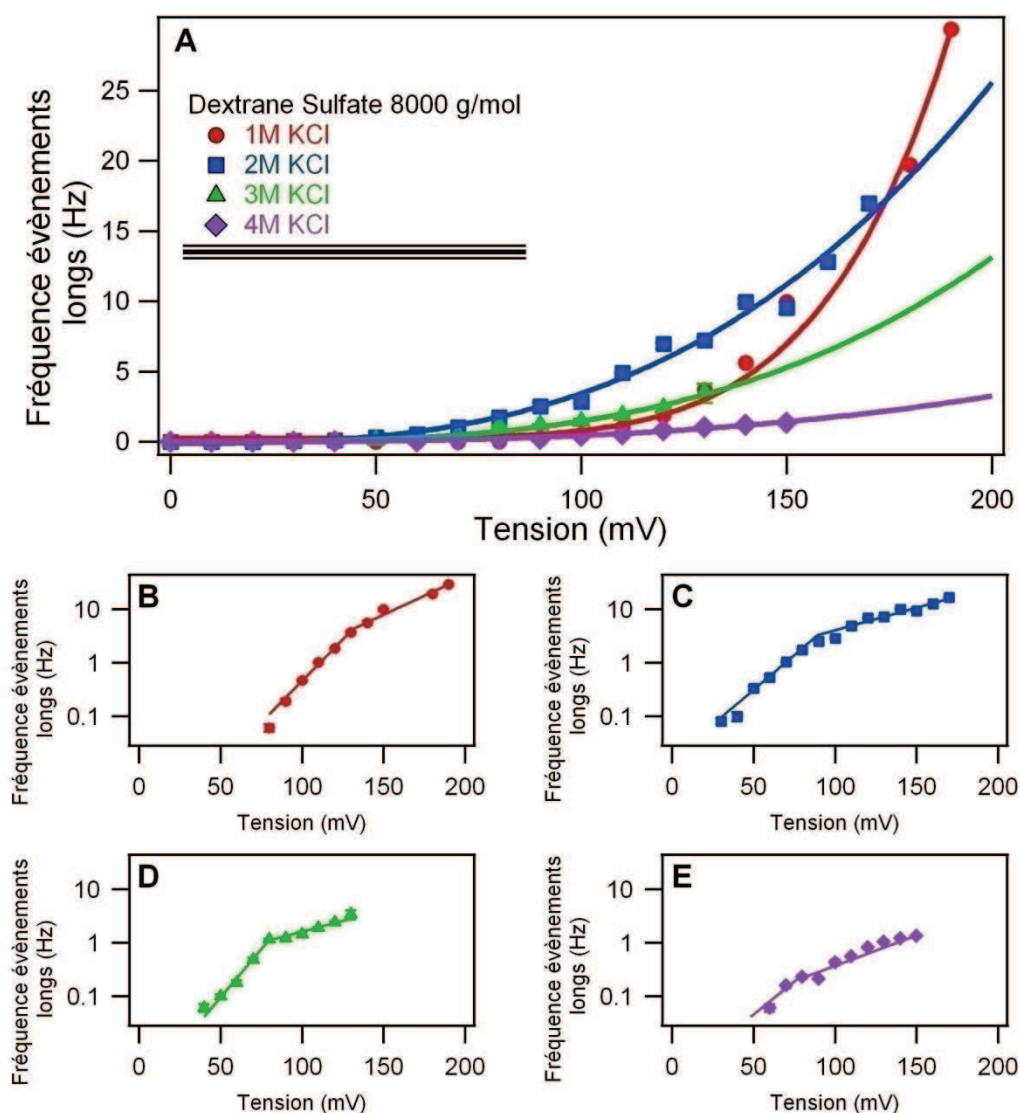


**Figure 91** : Traces montrant la translocation de molécules de dextrane sulfate 8000 (100  $\mu\text{M}$ ) à travers un pore d' $\alpha$ -hémolysine à différentes forces ioniques et pour deux différentes tensions (50 mV à gauche et 130 mV à droite).

On voit qu'à de faibles tensions (inférieures à 70 mV à 1 M en KCl ou inférieures à 30 mV pour des concentrations supérieures à 2 M en KCl) aucun événement n'apparaît, tandis que lorsque la tension augmente des événements commencent à être observables. Ceci est dû à des phénomènes de barrières de potentiel. A 1M en KCl aucun événement n'apparaît à 50 mV alors qu'ils apparaissent lorsque la concentration en KCl est plus élevée (Figure 91, colonne de gauche). Cela signifie que la barrière de potentiel a été abaissée par la concentration en KCl plus importante, permettant aux oligosaccharides de traverser le pore à des tensions plus faibles. Sur cette même Figure 91, mais sur les colonnes de droite, sont présentées des traces enregistrées à une tension de 130 mV. On voit que la fréquence augmente légèrement à 2M en KCl par rapport à la fréquence à 1M en KCl mais celle-ci décroît de plus en plus à 3 et 4 M en KCl. La décroissance des fréquences à ces hautes forces ioniques peut s'expliquer par le fait que la forte concentration en KCl apporte de nombreux contre-ions qui vont écranter les interactions entre les molécules étudiées. Celles-ci se comportent alors de plus en plus comme des molécules neutres, dont la fréquence de passage va dépendre principalement de la diffusion en solution et non plus du potentiel appliqué.



En étudiant l'évolution des fréquences de translocation en fonction de la tension appliquée (Figure 92), on voit qu'elle suit un comportement exponentiel pour lequel on observe deux régimes. Le premier régime correspond à une rapide augmentation de la fréquence avec la tension. L'augmentation des fréquences est à ce moment limitée par les phénomènes de barrière de potentiel. Ce régime est observé pour des tensions allant de 0 à 130 mV à 1 M en KCl, de 0 à 90 mV à 2 M en KCl et de 0 à 80 mV à 3 et 4 M en KCl. Le deuxième régime montre une augmentation moins marquée des fréquences avec le potentiel appliqué. En effet, dans ces conditions-là, la barrière de potentiel est déjà franchie et c'est la diffusion qui est le paramètre limitant. Les molécules ne parviennent pas suffisamment rapidement à l'entrée du pore, les molécules arrivant jusqu'à l'entrée du pore par diffusion, pour pouvoir conserver la même augmentation de fréquence que pour le premier régime.



**Figure 92 :** Evolution des fréquences en fonction de la tension appliquée avec une échelle (A) linéaire ou logarithmique à (B) 1 M, (C) 2 M, (D) 3 M ou (E) 4 M en KCl. Le dextrane sulfate est ajoutée en solution à 100  $\mu$ M.

De plus, on remarque (Figure 92, A) que la pente de l'exponentielle est très importante lorsque la concentration en KCl est égale à 1 M, alors qu'elle est très faible pour une concentration en KCl égale à 4 M. Plus la force ionique augmente, plus cette pente s'affaiblit. Le confinement des molécules anioniques de dextrane sulfate est donc de plus en plus faible au fur et à mesure que l'on augmente la force ionique, à

l'inverse de ce qu'ont trouvé Rodrigues *et al.* [34] qui ont observé une augmentation de la fréquence des événements dus à des molécules de poly(éthylène glycol) (PEG) lorsqu'ils augmentent la concentration en KCl. Ils observent également une augmentation des fréquences avec la tension jusqu'à environ 150 mV puis la fréquence commence à décroître. Nous n'observons pas ce comportement pour nos expériences avec des molécules de dextrane sulfate. Il est possible que la fréquence des molécules de PEG évolue avec la tension bien que ces molécules soient électriquement neutres car elles complexent des ions  $K^+$  en solution et se comportent donc comme des molécules positivement chargées. La décroissance des fréquences pour des tensions élevées est peut-être due à une décomplexation des ions  $K^+$  avec les molécules de PEG (ou au moins une diminution). Les molécules de dextrane sulfate étant négativement chargées et ces charges étant portées par la chaîne et non le résultat d'une complexation avec des ions présents en solution, les fréquences d'événements augmentent constamment avec la tension. Quant à la décroissance des fréquences avec l'augmentation de la concentration en KCl, cela reste cohérent avec les résultats obtenus par Rodrigues *et al.* dont les PEGs, agissant comme des molécules positivement chargées, voient leur fréquence d'événements augmenter avec la concentration en KCl.

En plus des fréquences de translocation des molécules, on peut également analyser le taux de blocage des ces molécules lorsqu'elles traversent le pore. Sur la Figure 93 sont reportés les taux de blocage de molécules de dextrane sulfate 8000, à différentes concentration en KCl et pour différentes tensions. On voit qu'à partir de 80 mV, le taux de blocage décroît légèrement lorsque la tension augmente ce qui pourrait indiquer que les molécules sont plus étirées lorsqu'elles traversent le pore. Elles prennent moins de volume ce qui entraîne donc une diminution du taux de blocage. On voit également que les taux de blocage sont plus importants à haute force ionique (à 3 et 4 M en KCl). Le blocage du courant est supérieur d'environ 3 ou 4 %, ce qui peut paraître négligeable, mais cela montre que les molécules adoptent une conformation légèrement moins étirée à 3 et 4 M en KCl qu'à 1 et 2 M.

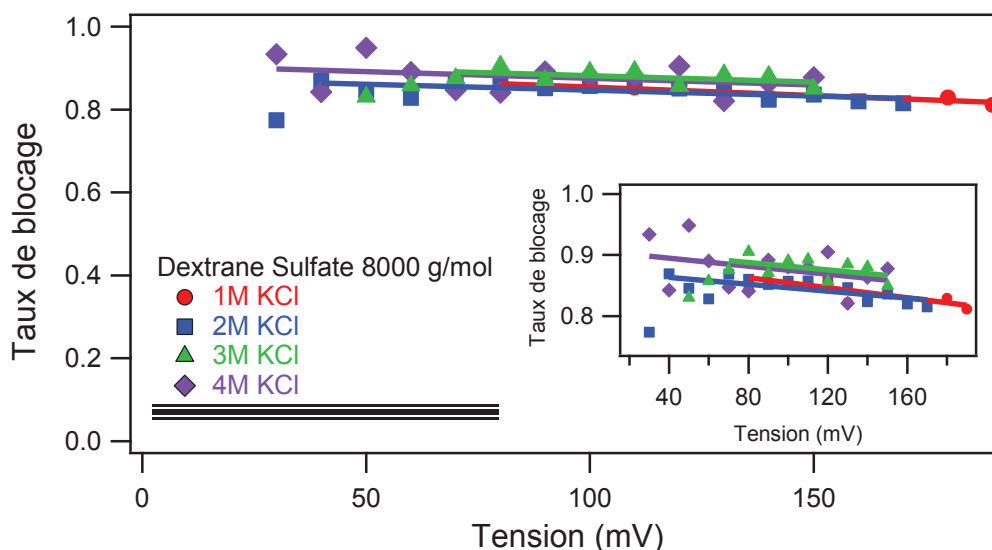


Figure 93 : Evolution du taux de blocage de molécules de dextrane sulfate 8000 à différentes forces ioniques en fonction de la tension appliquée. En insert, zoom autour de taux de blocage compris entre 0,7 et 1.

Ces analyses reprennent et complètent celles précédemment effectuées au laboratoire par Ludovic Brun [31, 38] sur le dextrane sulfate 8000. On voit que le taux de blocage ne varie que très peu avec la tension pour les molécules de dextrane sulfate 8000. Il faudrait effectuer les mêmes expériences avec les oligosaccharides de l'acide hyaluronique et un pore d'aérolysine pour voir si le même comportement est observable. Si le comportement n'est pas le même et que le taux de blocage varie, il pourrait être intéressant d'observer les différences de conformations et les différences de données en résultant. On voit en tout cas qu'à fortes tensions, avec l'utilisation d'un nanopore d' $\alpha$ -hémolysine, l'utilisation de solutions tamponnées à 1 M KCl est plus intéressante pour obtenir des fréquences d'événements plus importantes tandis qu'à plus faibles tensions c'est une solution tamponnée à 2 M KCl qui semble le mieux adaptée. Ces études doivent être effectuées avec un pore d'aérolysine et des oligosaccharides de l'acide hyaluronique pour confirmer ces résultats.

## II.8. Conclusion

Ces expériences ont permis de montrer que la technique d'analyse par translocation à travers un nanopore utilisée précédemment pour les acides nucléiques, protéines et polymères, est également applicable à l'étude des polysaccharides. Nous avons en effet été capables de discriminer différents oligosaccharides de l'acide hyaluronique, différents d'une seule unité disaccharidique, à travers un nanopore d'aérolysine. Nous avons également été en mesure de prouver la translocation effective de ces oligosaccharides, passant du compartiment d'entrée *cis* au compartiment *trans*, par spectrométrie de masse à l'aide d'un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap, équipé d'une source électrospray (ESI-MS). L'étude de la translocation des oligosaccharides d'héparine n'a cependant pas été aussi simple que pour l'acide hyaluronique. En effet, à 1 M KCl, aucun événement ne semble pouvoir être détecté, cependant, après avoir augmenté la force ionique jusqu'à 4,5 M KCl, il semblerait être possible de détecter la translocation de ces oligosaccharides. Cette étude demande néanmoins de plus amples expériences.

L'étude de la translocation d'oligosaccharides d'acide hyaluronique et d'héparine à travers un nanopore d' $\alpha$ -hémolysine a également été menée sans toutefois nous fournir de résultats très probants. Ces expériences nous ont cependant permis de mettre en évidence les différences de comportement des oligosaccharides à travers ces deux nanopores. En effet ceux-ci traversent le nanopore d' $\alpha$ -hémolysine beaucoup plus rapidement qu'à travers le nanopore d'aérolysine. Ceci expliquerait le fait que nous n'observions aucun événement pour les oligosaccharides de l'acide hyaluronique.

Les oligosaccharides d'héparine n'ont également entraîné que trop peu d'événements, nous avons donc étudié un oligosaccharide du dermatane sulfate, nous permettant d'affirmer que la présence des groupements sulfates au sein d'une chaîne ne bloque pas leur translocation. Cette expérience a également été menée sur un dextrane sulfate 8000, pour lequel des études sur toute une gamme de potentiel (30 à 200 mV) ont été réalisées.

## II.9. Références bibliographiques

1. Bishop, J.R., Schuksz, M., and Esko, J.D., *Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology*. Nature, 2007. **446**(7139): p. 1030-7.
2. Afratis, N., Gialeli, C., Nikitovic, D., Tsegenidis, T., Karousou, E., Theocharis, A.D., Pavao, M.S., Tzanakakis, G.N., and Karamanos, N.K., *Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment*. FEBS J, 2012. **279**(7): p. 1177-97.
3. Deamer, D.W. and Branton, D., *Characterization of Nucleic Acids by Nanopore Analysis*. Accounts of Chemical Research, 2002. **35**(10): p. 817-825.
4. Kasianowicz, J.J., Brandin, E., Branton, D., and Deamer, D.W., *Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 13770-13773.
5. Movileanu, L., Schmittschmitt, J.P., Martin Scholtz, J., and Bayley, H., *Interactions of Peptides with a Protein Pore*. Biophysical Journal, 2005. **89**(2): p. 1030-1045.
6. Merstorf, C., Cressiot, B., Pastoriza-Gallego, M., Oukhaled, A., Betton, J.M., Auvray, L., and Pelta, J., *Wild type, mutant protein unfolding and phase transition detected by single-nanopore recording*. ACS Chem Biol, 2012. **7**(4): p. 652-8.
7. Oukhaled, G., Mathé, J., Biance, A.L., Bacri, L., Betton, J.M., Lairez, D., Pelta, J., and Auvray, L., *Unfolding of Proteins and Long Transient Conformations Detected by Single Nanopore Recording*. Physical Review Letters, 2007. **98**(15): p. 158101.
8. Oukhaled, A.G., Biance, A.L., Pelta, J., Auvray, L., and Bacri, L., *Transport of long neutral polymers in the semidilute regime through a protein nanopore*. Phys Rev Lett, 2012. **108**(8): p. 088104.
9. Robertson, J.W., Rodrigues, C.G., Stanford, V.M., Robinson, K.A., Krasilnikov, O.V., and Kasianowicz, J.J., *Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(20): p. 8207-11.
10. Reiner, J.E., Kasianowicz, J.J., Nablo, B.J., and Robertson, J.W.F., *Theory for polymer analysis using nanopore-based single-molecule mass spectrometry*. Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2010. **107**(27): p. 12080-12085.
11. Bacri, L., Oukhaled, A., Hémon, E., Bassafoula, F.B., Auvray, L., and Daniel, R., *Discrimination of neutral oligosaccharides through a nanopore*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011. **412**(4): p. 561-564.
12. Fennouri, A., Przybylski, C., Pastoriza-Gallego, M., Bacri, L., Auvray, L., and Daniel, R., *Single Molecule Detection of Glycosaminoglycan Hyaluronic Acid Oligosaccharides and Depolymerization Enzyme Activity Using a Protein Nanopore*. ACS Nano, 2012. **6**(11): p. 9672-9678.
13. Price, K.N., Al, T., Baker, D.C., Chisena, C., and Cysyk, R.L., *Isolation and characterization by electrospray-ionization mass spectrometry and high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides derived from hyaluronic acid by hyaluronate lyase digestion: observation of some heretofore unobserved oligosaccharides that contain an odd number of units*. Carbohydr Res, 1997. **303**(3): p. 303-11.
14. Gama, C.I. and Hsieh-Wilson, L.C., *Chemical approaches to deciphering the glycosaminoglycan code*. Curr Opin Chem Biol, 2005. **9**(6): p. 609-19.
15. Pomin, V.H., Sharp, J.S., Li, X., Wang, L., and Prestegard, J.H., *Characterization of Glycosaminoglycans by <sup>15</sup>N NMR Spectroscopy and in Vivo Isotopic Labeling*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(10): p. 4078-4088.
16. Logiciel de calcul de la charge nette d'une protéine. Available from: <http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>.
17. Wilmsen, H.U., Pattus, F., and Buckley, J.T., *Aerolysin, a hemolysin from Aeromonas hydrophila, forms voltage-gated channels in planar lipid bilayers*. Journal of Membrane Biology, 1990. **115**(1): p. 71-81.
18. Meller, A., *Dynamics of polynucleotide transport through nanometre-scale pores*. Journal of Physics: Condensed Matter, 2003. **15**(17): p. R581.
19. Meller, A., Nivon, L., Brandin, E., Golovchenko, J., and Branton, D., *Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(3): p. 1079-84.

20. Meller, A., Nivon, L., and Branton, D., *Voltage-Driven DNA Translocations through a Nanopore*. Physical Review Letters, 2001. **86**(15): p. 3435-3438.
21. Meller, A. and Branton, D., *Single molecule measurements of DNA transport through a nanopore*. Electrophoresis, 2002. **23**(16): p. 2583-91.
22. Coulter, W.H., *Means for counting particles suspended in a fluid*. 1953, Coulter, Wallace H.: United States.
23. Henrickson, S.E., Misakian, M., Robertson, B., and Kasianowicz, J.J., *Driven DNA Transport into an Asymmetric Nanometer-Scale Pore*. Physical Review Letters, 2000. **85**(14): p. 3057-3060.
24. Kasianowicz, J.J., Henrickson, S.E., Weetall, H.H., and Robertson, B., *Simultaneous multianalyte detection with a nanometer-scale pore*. Anal Chem, 2001. **73**(10): p. 2268-72.
25. Song, L., Hobough, M.R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H., and Gouaux, J.E., *Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore*. Science, 1996. **274**(5294): p. 1859-66.
26. Parker, M.W., Buckley, J.T., Postma, J.P.M., Tucker, A.D., Leonard, K., Pattus, F., and Tsernoglou, D., *Structure of the Aeromonas toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states*. Nature, 1994. **367**(6460): p. 292-295.
27. Movileanu, L., Cheley, S., and Bayley, H., *Partitioning of individual flexible polymers into a nanoscopic protein pore*. Biophys J, 2003. **85**(2): p. 897-910.
28. Oukhaled, A., Bacri, L., Pastoriza-Gallego, M., Betton, J.-M., and Pelta, J., *Sensing Proteins through Nanopores: Fundamental to Applications*. ACS Chemical Biology, 2012.
29. Pedone, D., Firnkes, M., and Rant, U., *Data analysis of translocation events in nanopore experiments*. Anal Chem, 2009. **81**(23): p. 9689-94.
30. Payet, L., Martinho, M., Pastoriza-Gallego, M., Betton, J.-M., Auvray, L., Pelta, J., and Mathé, J., *Thermal Unfolding of Proteins Probed at the Single Molecule Level Using Nanopores*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(9): p. 4071-4076.
31. Brun, L., Pastoriza-Gallego, M., Oukhaled, G., Mathé, J., Bacri, L., Auvray, L., and Pelta, J., *Dynamics of Polyelectrolyte Transport through a Protein Channel as a Function of Applied Voltage*. Physical Review Letters, 2008. **100**(15): p. 158302.
32. Gershow, M. and Golovchenko, J.A., *Recapturing and trapping single molecules with a solid-state nanopore*. Nat Nano, 2007. **2**(12): p. 775-779.
33. Pavlov, G., Finet, S., Tatarenko, K., Korneeva, E., and Ebel, C., *Conformation of heparin studied with macromolecular hydrodynamic methods and X-ray scattering*. European Biophysics Journal, 2003. **32**(5): p. 437-449.
34. Rodrigues, C.G., Machado, D.C., Chevtchenko, S.F., and Krasilnikov, O.V., *Mechanism of KCl Enhancement in Detection of Nonionic Polymers by Nanopore Sensors*. Biophysical Journal, 2008. **95**(11): p. 5186-5192.
35. Oukhaled, G., Bacri, L., Mathé, J., Pelta, J., and Auvray, L., *Effect of screening on the transport of polyelectrolytes through nanopores*. EPL (Europhysics Letters), 2008. **82**(4): p. 48003.
36. Trowbridge, J.M. and Gallo, R.L., *Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan*. Glycobiology, 2002. **12**(9): p. 117R-125R.
37. Pastoriza-Gallego, M., Gibrat, G., Thiebot, B., Betton, J.-M., and Pelta, J., *Polyelectrolyte and unfolded protein pore entrance depends on the pore geometry*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2009. **1788**(6): p. 1377-1386.
38. Gibrat, G., Pastoriza-Gallego, M., Thiebot, B., Breton, M.-F., Auvray, L., and Pelta, J., *Polyelectrolyte Entry and Transport through an Asymmetric  $\alpha$ -Hemolysin Channel*. The Journal of Physical Chemistry B, 2008. **112**(47): p. 14687-14691.



---

### III. Chapitre 3 :

## Détection par nanopore d'une réaction enzymatique : dépolymérisation de l'acide hyaluronique catalysée par l'hydrolase hyaluronidase

---

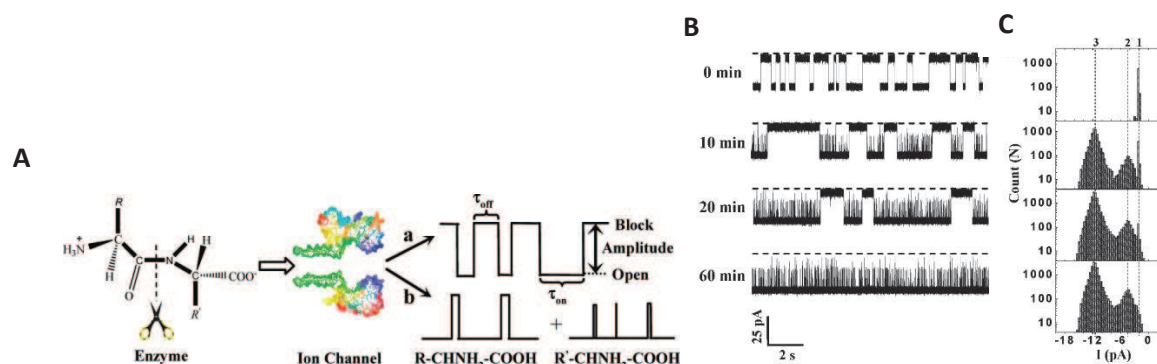
<b>III.1.</b>	<b><i>Dégradation enzymatique des glycosaminoglycanes</i></b>	<b>146</b>
<b>III.2.</b>	<b><i>Etude de la réaction enzymatique de l'acide hyaluronique par spectroscopie UV</i></b>	<b>148</b>
<b>III.3.</b>	<b><i>Etude de la dépolymérisation enzymatique de l'acide hyaluronique par translocation à travers un nanopore</i></b>	<b>152</b>
<b>III.4.</b>	<b><i>Comparaison des données obtenues par nanopore et par spectroscopie UV</i></b>	<b>169</b>
<b>III.5.</b>	<b><i>Conclusion</i></b>	<b>170</b>
<b>III.6.</b>	<b><i>Références bibliographiques</i></b>	<b>171</b>



Dans le chapitre précédent, nous avons montré que la technique d'analyse par nanopore est capable de discriminer différents oligosaccharides à l'échelle de la molécule unique. Ceci ouvre la voie vers de nouvelles applications analytiques prometteuses à l'échelle de microvolumes. L'une de ces applications concerne le suivi d'une réaction enzymatique. Nous allons illustrer cette application avec l'étude de la dépolymérisation enzymatique de l'acide hyaluronique par la hyaluronidase (EC 3.2.1.35).

Jusqu'à présent, très peu d'études de réactions enzymatiques ont été suivies par nanopore, seulement trois études s'y étant consacrée. La première expérience date de 1996, faisant partie de l'étude pionnière de Kasianowicz *et al.* [1], démontrant l'utilisation d'un nanopore comme un moyen d'analyse. Les auteurs ont étudié le clivage de chaînes de poly[U] par la ribonucléase A, montrant la possibilité de suivre une cinétique enzymatique.

Q. Zhao *et al.* [2] ont utilisé les propriétés des nanopores ainsi que la possibilité d'analyse des peptides pour les appliquer au suivi du clivage d'un peptide, l'A- $\beta$ (10-20), par une enzyme. Ce peptide est fragmenté en deux lorsqu'une enzyme spécifique est présente en solution. A  $t=0$ , seuls sont observés les événements correspondant au peptide total, puis dès l'ajout de l'enzyme, des événements de différents types, correspondant aux deux fragments créés, commencent à apparaître en plus des événements produits par le peptide A- $\beta$ (10-20). Au bout d'une heure de réaction, le peptide est presque totalement fragmenté et ne sont plus observés que les événements dépendants des deux produits de cette réaction enzymatique.



**Figure 94 :** (A) Représentation schématique du clivage du peptide par l'enzyme avec les signaux électriques obtenus. (B) Traces à différents temps de réaction. (C) Histogramme des intensités des traces à chacun des temps de réaction associés. [2]

La troisième et dernière étude est un peu différente. Elle a été réalisée par Macrae M. X. *et al.* [3] et étudie l'activité de la phosphatase alcaline, une enzyme catalysant l'hydrolyse d'un groupement phosphate situé à l'extrémité C-terminale de la gramicidine A, un peptide capable de former un canal ionique. Cette hydrolyse enzymatique réduit la conductivité de la gramicidine A, permettant d'observer l'évolution de la conductance totale du pore au fur et à mesure de l'action de l'enzyme.

Cependant, aucune de ces études ne traite des paramètres cinétiques de ces réactions enzymatiques, c'est pourquoi nous avons tenté de suivre et d'étudier la cinétique de la dépolymérisation enzymatique de l'acide hyaluronique par la hyaluronidase, par translocation à travers un nanopore d'aérollysine puis à travers un nanopore d' $\alpha$ -hémolysine. En première partie, nous avons effectué le suivi de la réaction de deux différentes manières. La première consiste à réaliser cette réaction enzymatique dans un bain marie, à 37 °C, dans les conditions optimales de fonctionnement de l'enzyme. Des prélèvements sont effectués à différents moments de la réaction pour ensuite être analysés par nanopore. La deuxième

méthode consiste à suivre cette dépolymérisation en temps réel, directement dans le compartiment, à travers le nanopore d'aérolysine. Les conditions expérimentales ont donc avant cela été adaptées pour permettre la détection électrique lors de la translocation des macromolécules d'acide hyaluronique à travers le nanopore. En faisant varier la concentration initiale en acide hyaluronique, nous avons déterminé les paramètres cinétiques ( $K_M$  et  $v_{max}$ ) de cette réaction enzymatique. La réaction enzymatique de l'acide hyaluronique a également été suivie à travers le nanopore d' $\alpha$ -hémolysine, afin de comparer la translocation de longues chaînes à travers les deux différents pores.

Ce suivi par détection à l'échelle de la molécule unique sera comparé au suivi de cette même réaction de dépolymérisation de l'acide hyaluronique, par spectroscopie UV-Visible.

### III.1. Dégradation enzymatique des glycosaminoglycanes

Une réaction enzymatique est une réaction chimique ou biochimique catalysée par une enzyme.

La catalyse des réactions dans les cellules est vitale car sans enzyme les taux de réaction sont très faibles. L'enzyme utilisée dans le cadre de cette thèse est la hyaluronidase [4] (hyaluronidase de testicules de boeuf, Sigma, H3884), une hydrolase permettant de catalyser l'hydrolyse des liaisons glycosidiques  $\beta(1\rightarrow4)$  entre les résidus D-glucuronique et N-acétyl-D-glucosamine de l'acide hyaluronique (Figure 95).

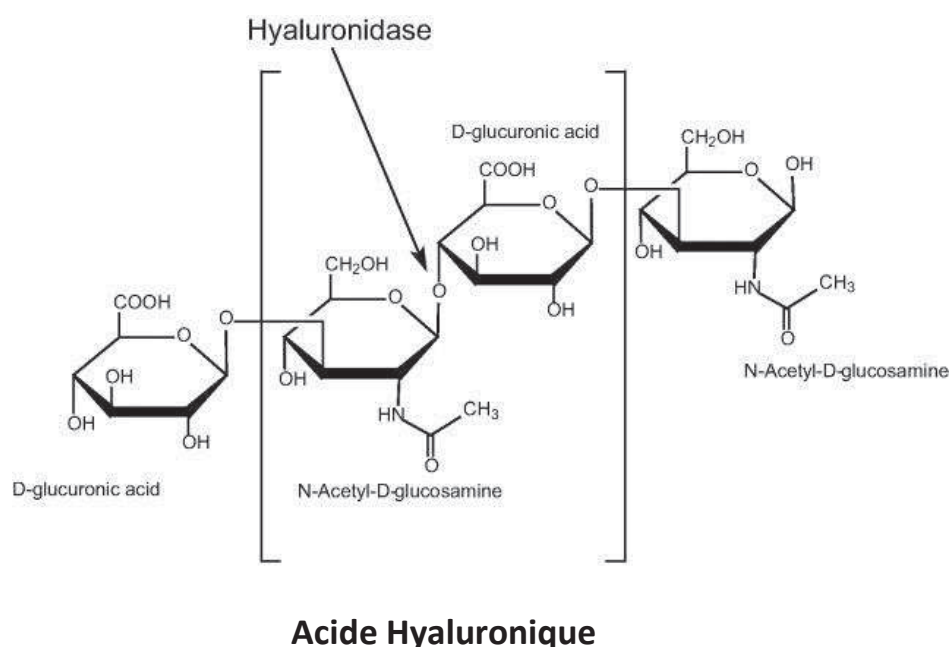
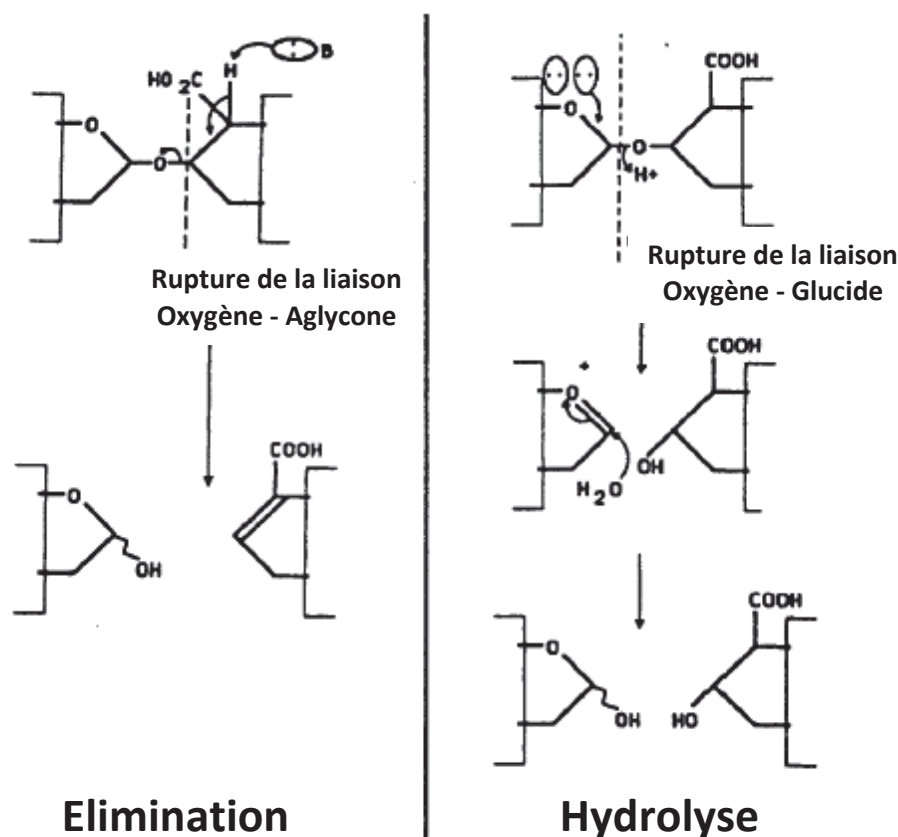


Figure 95 : Principe de fonctionnement de la hyaluronidase sur l'acide hyaluronique.

Les dépolymérisations enzymatiques des glycosaminoglycanes peuvent être catalysées par deux différents types d'enzymes : par élimination à l'aide d'une lyase (EC 4.2.2.-) ou par clivage hydrolytique à

l'aide d'une hydrolase (EC 3.2.1.-) [5]. Les lyases clivent les liaisons osidiques uniquement du côté non-réducteur des acides uroniques, le groupement carboxylique participant à la réaction. L'avancement de la réaction peut ensuite être suivi en mesurant l'absorbance à 232 nm dû à la formation d'une liaison insaturée  $\Delta 4,5$ . A l'inverse, les hydrolases peuvent agir sur l'une ou l'autre des liaisons du disaccharide, ne formant pas de liaison insaturée, mais n'absorbent donc pas la lumière UV. Un marquage radioactif ou chimique est nécessaire dans ce cas pour pouvoir effectuer le suivi de la réaction. Le mécanisme de fonctionnement de ces deux différents types d'enzymes est représenté ci-dessous sur la [Figure 96](#).



[Figure 96](#) : Schéma illustrant le mode fonctionnement des lyases (à gauche) et des hydrolases (à droite) sur un glycosaminoglycane. [5]

Trois différents types de lyases dégradant les glycosaminoglycanes (les héparinases, chondroïtinases et hyaluronidases) ont été décrits, chacun d'entre eux étant ensuite subdivisé en plusieurs catégories en fonction de leurs spécificités. La hyaluronidase lyase permet, de complètement dégrader l'acide hyaluronique en disaccharides en 24h alors que la hyaluronidase hydrolase produit un mélange de tétra- et hexasaccharides après 24h de réaction [6, 7].

Deux types de hyaluronidase hydrolase ont été isolés : le type I (EC 3.2.1.35) agit sur l'extrémité non réductrice du disaccharide, et le type II (EC 3.2.1.36) sur l'extrémité réductrice de l'acide glucuronique. Ces deux hyaluronidases produisent un mélange d'oligosaccharides comprenant de 1 à 23 unités disaccharidiques dès les premières minutes de réaction. La hyaluronidase de type I forme plusieurs oligosaccharides intermédiaires et les produits finaux obtenus sont en majorité des tétra- et hexasaccharides [5]. Cette enzyme (hyaluronidase de testicules de bœuf, Sigma, H3884, EC 3.2.1.35) va être utilisée pour nos expériences de dépolymérisation. Les hyaluronidases de type I sont de la famille des endo- $\beta$ -N-acétylhexosaminidase, catalysent aussi l'hydrolyse des chondroïtines et chondroïtines sulfates,

cependant à des vitesses plus lentes [8, 9]. Six différentes séquences de la hyaluronidase sont retrouvées dans le génome humain mais seules trois d'entre elles (Hyal1, Hyal2 et PH-20) ont une activité enzymatique ayant déjà été détectée. Hyal2 clive l'acide hyaluronique de la matrice extracellulaire jusqu'à avoir des molécules composées d'environ 50 disaccharides (environ  $20 \cdot 10^3$  g/mol) puis c'est Hyal1 qui prend le relais pour cliver ces chaînes en petits fragments [9]. L'enzyme hydrolyse les liaisons  $\beta(1 \rightarrow 4)$  tout en laissant les liaisons  $\beta(1 \rightarrow 3)$  intactes. Une explication à cela pourrait être la structure en hélice de l'acide hyaluronique, exposant principalement les liaisons  $\beta(1 \rightarrow 4)$  et non les liaisons  $\beta(1 \rightarrow 3)$ . De plus la plus grande flexibilité des liaisons  $\beta(1 \rightarrow 4)$  par rapport aux liaisons  $\beta(1 \rightarrow 3)$  pourrait également expliquer pourquoi les liaisons  $\beta(1 \rightarrow 3)$  ne sont pas affectées [8]. Cependant, le mécanisme précis n'est pas encore connu et est toujours à l'étude.

## **III.2. Etude de la réaction enzymatique de l'acide hyaluronique par spectroscopie UV**

### **III.2.1. Etude à une concentration de substrat fixée**

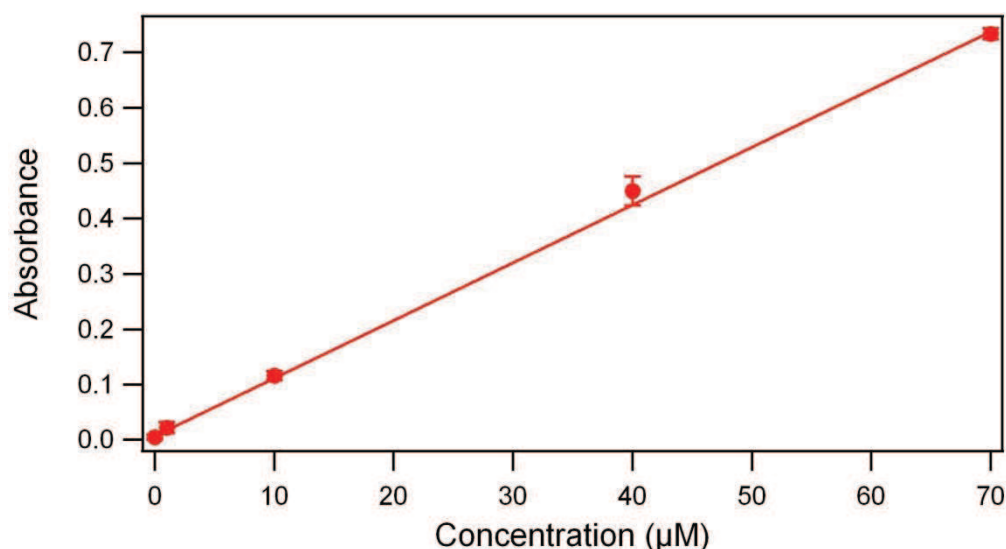
#### **III.2.1.a. Spectroscopie UV-Visible**

Avant d'effectuer le suivi réaction de dépolymérisation enzymatique de l'acide hyaluronique par la hyaluronidase, à l'échelle de la molécule unique nous allons suivre cette même réaction par spectroscopie UV-Visible, et nous comparerons ces deux techniques entre elles. Pour cela, nous avons effectué les dépolymérisations dans différentes conditions dans un bain-marie ou un bain sec, chauffés à 21 ou 37 °C. Les conditions expérimentales reproduites ici sont les mêmes que celles qui avaient été fixées lors de l'analyse par nanopore dans le Chapitre II, de façon à pouvoir effectuer une comparaison entre ces deux méthodes. Les échantillons prélevés ont ensuite été mélangés à un sel de tetrazonium, le 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate] (WST-1) puis chauffés 1h à 60 °C. Ce produit réagit avec les extrémités réductrices des polysaccharides et provoque une coloration bleue de la solution, plus ou moins importante en fonction de la concentration en polysaccharides en solution. L'absorbance des différents échantillons est ensuite mesurée sur un spectrophotomètre UV, à la longueur d'onde de 584 nm.

#### **III.2.1.b. Etalonnage**

A l'aide d'une solution d'hexasaccharide de l'acide hyaluronique, nous avons tracé une droite étalon (Figure 97) pour pouvoir établir la relation entre la concentration en macromolécules en solution et l'absorbance mesurée.





**Figure 97** : Droite étalon reliant l'absorbance à la concentration en molécules. Cette droite a été tracée pour des solutions de différentes concentrations en hexasaccharide de l'acide hyaluronique.

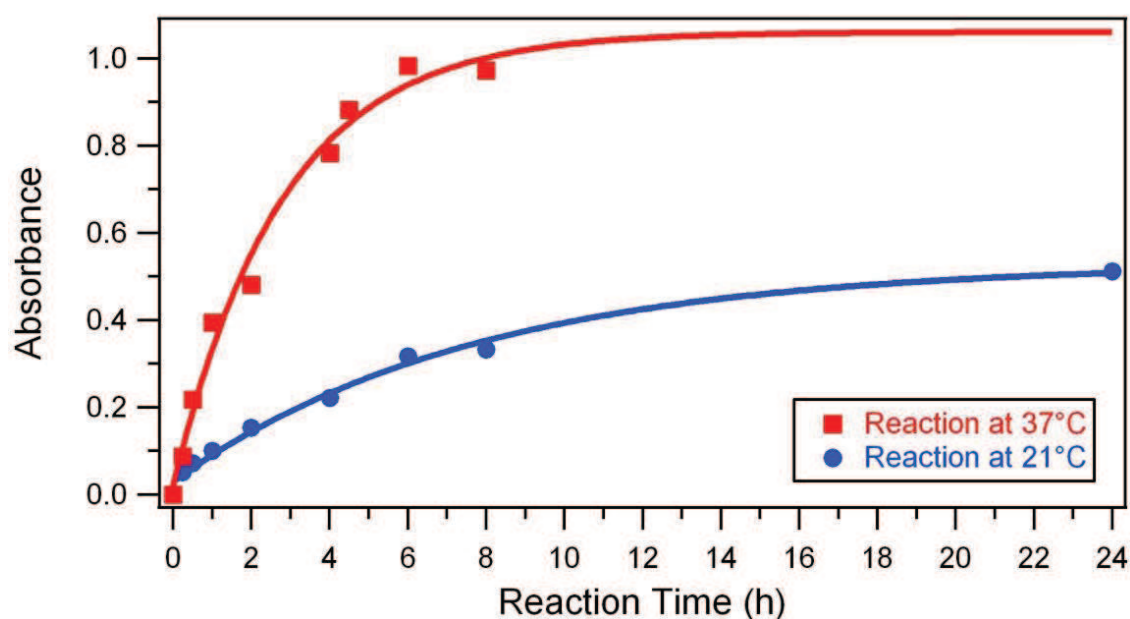
L'équation de cette droite est la suivante :

$$D.O = 0,0104 \times C + 0,0073$$

Avec D.O la densité optique (l'absorbance) mesurée à 584 nm et C la concentration en molécules en solution, en µM.

### III.2.1.c. Réaction enzymatique

La réaction enzymatique est conduite à 37 °C dans une solution tampon NaAc 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 5,2 ( $[HA] = 3 \text{ mg/mL}$  et  $[hyaluronidase] = 112 \text{ unités}$ ) et à 21 °C dans une solution tampon constituée de 800 µL de NaAc 0,1 M, NaCl 0,15 M et de 200 µL de solution HEPES 5 mM, KCl 4,5 M, à pH 7,5. Des échantillons sont prélevés à différents temps puis mélangés au réactif WST-1. Les densités optiques ont ensuite été reportées sur un graphe pour tracer l'allure générale de la courbe ([Figure 98](#)).



**Figure 98** : Analyse spectrophotométrique de la réaction de dépolymérisation de l'acide hyaluronique. En rouge, réaction enzymatique de l'acide hyaluronique (3 mg/mL) avec la hyaluronidase (224 unités) à 37 °C dans 0,1 M NaAc, 0,15 M NaCl, pH 5,2 et avec une dilution au 1/200<sup>e</sup>. En bleu, réaction enzymatique de l'acide hyaluronique (0,75 mg/mL) par la hyaluronidase (112 unités) à 21 °C dans 800 µL 0,1 M NaAc, 0,15 M NaCl mélangé à 200 µL 4,5 M KCl, 5 mM HEPES, pH 7,5 et avec une dilution au 1/100<sup>e</sup>.

La dépolymérisation est bien plus rapide à 37 °C et à faible force ionique (Figure 98, courbe rouge) qu'à 21 °C et à force ionique élevée (Figure 98, courbe bleue). Ce comportement est encore plus visible sachant que les échantillons prélevés pendant la réaction enzymatique dans les conditions optimales (Figure 98, courbe rouge) ont été dilués au 1/200<sup>e</sup> pour pouvoir maintenir les macromolécules en solution dans les limites de concentration détectables par cette technique. Cette dilution permet d'obtenir des valeurs d'absorbance comprises entre 0 et 1. A l'inverse, les échantillons prélevés pendant la réaction enzymatique mimant les conditions nanopores (Figure 98, courbe bleue) ont été dilués seulement au 1/100<sup>e</sup>, la réaction étant moins rapide, les concentrations en molécules en solutions sont plus faibles.

La Figure 99 ci-dessous montre l'absorbance mesurée à 37 °C dans une solution tampon NaAc 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 5,2 en fonction de l'absorbance mesurée à 21 °C dans une solution constituée d'un mélange de 800 µL de NaAc 0,1 M, NaCl 0,15 M et de 200 µL de solution HEPES 5 mM, KCl 4,5 M, à pH 7,5. On obtient une droite de pente égale à  $3,1 \pm 0,2$ . Cela signifie que la diminution de la température de 37 °C à 21 °C ainsi que l'augmentation de la force ionique entraînent une diminution de l'activité de l'enzyme d'un facteur 3, d'où une évolution plus lente de la réaction.

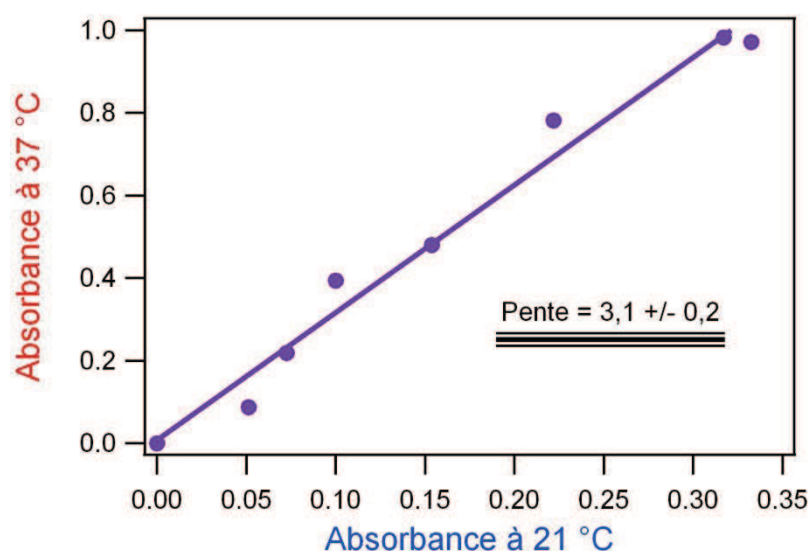


Figure 99 : Absorbance mesurée à 37 °C en fonction de celle mesurée à 21 °C.

On peut vérifier les écarts de vitesses entre ces deux expériences faites dans différentes conditions, comme nous l'avons fait pour les analyses nanopores en comparant les durées moyennes des événements. Après 24h de réaction à 21 °C, dans les mêmes conditions que les analyses en temps réel par nanopore, on trouve une densité optique de 0,5118. D'après l'équation ci-dessus, obtenue grâce à la courbe d'étalonnage tracée précédemment (Figure 97), cette densité optique correspond à une concentration en molécules égale à 4,85 mM (d'après l'équation on trouve 48,5  $\mu$ M mais en prenant en compte la dilution au 1/100<sup>e</sup> qui avait été réalisée, cela nous donne cette concentration de 4,85 mM). Après 10h de réaction, dans les mêmes conditions, on trouve une concentration en molécule égale à 3,71 mM. On peut ainsi suivre l'évolution du nombre de molécules en solution à chaque instant. Tout comme on l'avait observé par nanopore, on voit que cette concentration de 3,71 mM est déjà dépassée après moins de 30 minutes de réaction enzymatique à 37 °C, dans les conditions optimales de fonctionnement de l'enzyme. En effet, à ce moment là, on trouve une absorbance de 0,2184 ce qui nous donne une concentration de 4,06 mM (d'après l'équation on trouve 20,3  $\mu$ M mais en prenant en compte la dilution au 1/200<sup>e</sup> qui avait été réalisée, on trouve cette concentration de 4,06 mM).

### III.2.2. Etude à différentes concentrations de substrat

Les concentrations de substrat (l'acide hyaluronique) ont été modifiées, entre 0,75 et 0,075 mg/mL, et l'avancement de la réaction enzymatique a été suivi par spectroscopie UV, pour une même concentration en enzyme (la hyaluronidase, 112 unités). Ces expériences ont été faites pour trois différentes concentrations en acide hyaluronique,  $C_0 = 0,75$  mg/mL,  $C_0/3 = 0,25$  mg/mL et  $C_0/10 = 0,075$  mg/mL (Figure 100).

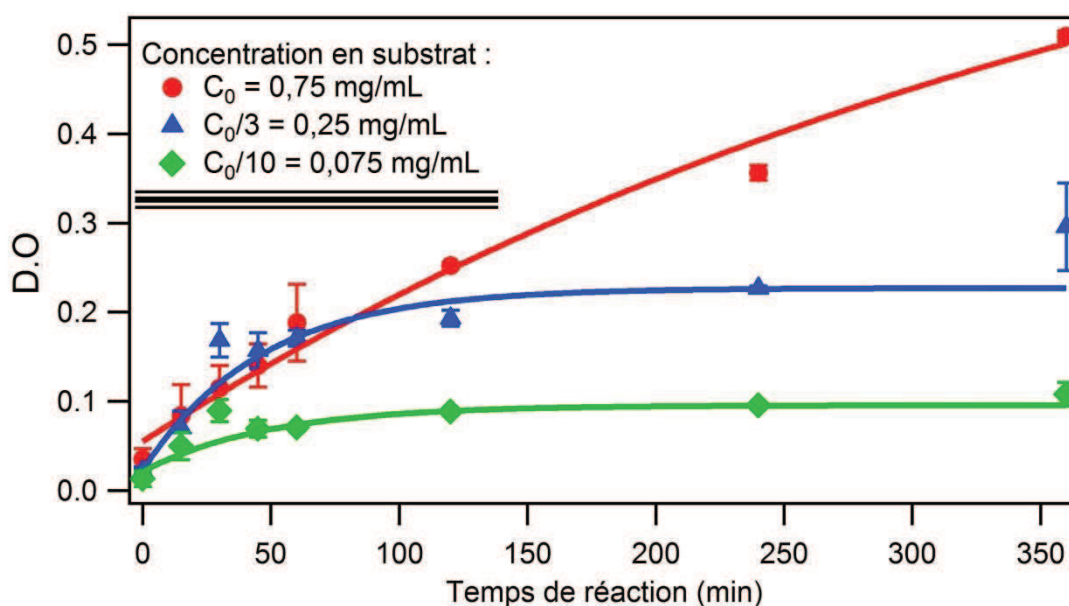


Figure 100 : Suivi enzymatique par spectroscopie UV pour différentes concentrations en substrat. La concentration en enzyme reste inchangée.

Par manque d'expériences à différentes concentrations (nous n'en avons que 3 différentes), il ne nous a pas été possible de tracer les courbes de type Michaelis-Menten pour pouvoir comparer les paramètres de cette réaction ( $K_M$  et  $v_{max}$ ) à ceux obtenus lors de la détection nanopore. On observe cependant l'évolution de la densité optique (proportionnelle à la concentration en oligosaccharides en solution) en fonction de la concentration initiale en substrat et de la durée de réaction.

### III.3. Etude de la dépolymérisation enzymatique de l'acide hyaluronique par translocation à travers un nanopore

Cette réaction de dépolymérisation a été suivie à travers les pores d'aérolysine et d' $\alpha$ -hémolysine. Nous comparerons les limites de résolution de ces deux nanopores.

#### III.3.1. Réaction enzymatique analysée à travers un pore d'aérolysine

Deux approches ont été utilisées : dans un premier temps, nous avons suivi la réaction de façon indirecte, en analysant par la technique des nanopores les échantillons prélevés à différents temps de la réaction enzymatique. Dans un second temps, la réaction enzymatique a lieu directement dans le compartiment des nanopores, permettant de suivre son évolution en temps réel.

### III.3.1.a. Suivi indirect de la réaction enzymatique par nanopore

#### Conditions de la réaction de dépolymérisation

Les conditions de la réaction de dépolymérisation de l'acide hyaluronique sont celles définies comme optimales pour le fonctionnement de la hyaluronidase soit 0,1 M NaAc, 0,15 M NaCl à pH 5,2. Des prélèvements sont effectués au cours de la réaction pour ensuite être analysés par mesures électriques de la translocation à travers le nanopore d'aérolysine.

#### Choix de la solution tampon utilisée pour la détection nanopore

La première étape, avant de pouvoir analyser les différents échantillons obtenus après réaction de la hyaluronidase sur l'acide hyaluronique, a été l'adaptation des conditions expérimentales aux expériences nanopore (NaAc 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 5,2). Le [Tableau 4](#) montre les différentes solutions tampon utilisées pour la réaction enzymatique et pour la détection nanopore.

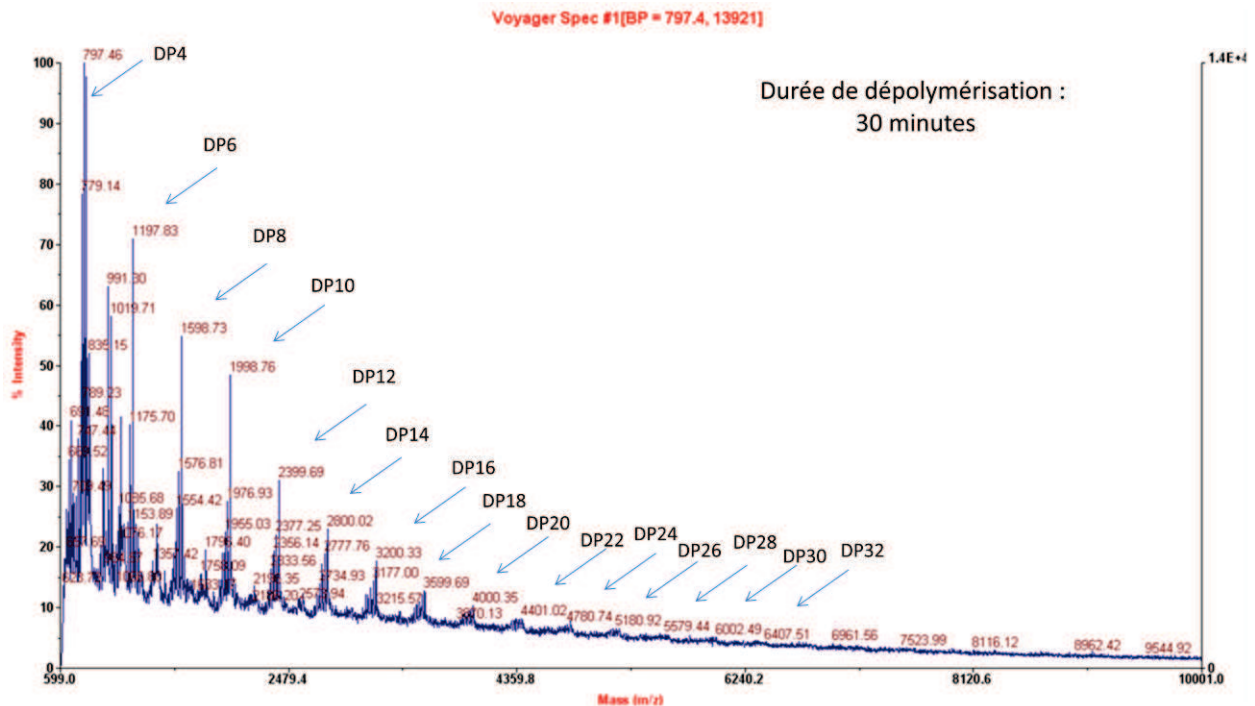
	Tampon de digestion	Tampon détection nanopore
Composition	NaCl 0,15 M, NaAc 0,1 M	KCl 1 M, HEPES 0,005 M
pH	5,2	7,5
Force Ionique	Faible	Suffisante
Intensité de pore ouvert	~ 7 pA	~ 32 pA
Formation de la membrane	Difficile	Simple
Efficacité de l'enzyme	Optimale	Réduite

**Tableau 4 : Différences entre le tampon de digestion et le tampon nanopore pour la détection nanopore.**

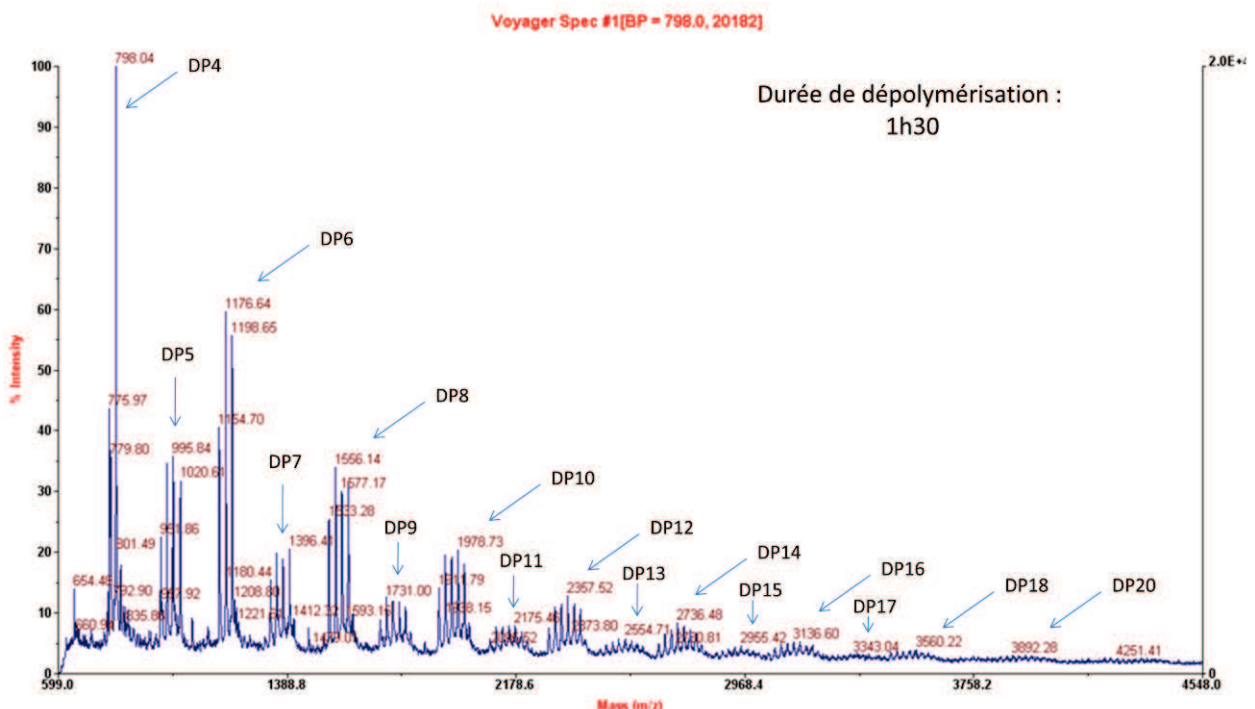
Le premier essai a été d'utiliser la solution tampon permettant le fonctionnement optimal de l'enzyme. Le problème qui s'est immédiatement posé a été la difficulté d'obtenir des bicouches lipidiques de faible épaisseur dans cette solution tampon [10]. L'augmentation du pH de la solution tampon (de 5,2 à 6) pour essayer d'améliorer la stabilité de la membrane mais sans succès. L'essai suivant a consisté à remplacer l'acétate de sodium par de l'HEPES 5 mM, à pH 7,5. La solution de NaCl 0,15 M a également été remplacée, dans le cas d'un autre essai, par du KCl 0,15 M. Dans les deux cas, des pores d'aérolysine ont pu être obtenus mais la trop faible force ionique ( $|\text{NaCl}|$  ou  $|\text{KCl}| = 0,15 \text{ M}$ ) étant trop faible, les courants de pore ouvert étaient trop peu élevés pour être facilement discernés du bruit, avec des intensités d'environ 6 à 7 pA. Nous avons ensuite augmenté la concentration en chlorure de sodium de 0,15 M à 1 M mais les membranes ont été très difficiles à affiner, probablement à cause de la présence du NaCl. Nous avons donc remplacé le NaCl par du KCl pour les tests suivants. La solution tampon utilisée était donc à ce moment constituée de KCl 1 M, NaAc 0,15M, pH 6,2 ou alors de KCl 1M, HEPES 5 mM, pH 6,2 mais ces deux différentes solutions tampon ne nous ont permis d'obtenir que très peu de pores d'aérolysine probablement à cause de la diminution de l'acidité de ces deux solutions. Nous avons finalement opté pour un mélange de 800  $\mu\text{L}$  du tampon utilisé pour la réaction enzymatique (NaAc 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 5,2) avec 200  $\mu\text{L}$  de KCl 4,5 M, 5 mM HEPES, pH 7,5 pour conserver une concentration finale en KCl proche de 1 M, concentration utilisée lors des expériences classiques de nanopores. La solution finale est tamponnée à un pH de 7,5.

### Caractérisation par spectrométrie de masse

Les prélèvements ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF afin de confirmer la formation de différents oligosaccharides de l'acide hyaluronique et de suivre une évolution des molécules présentes dans le milieu réactionnel. Les spectres de masse correspondant sont présentés ci-dessous [Figure 101](#), [Figure 102](#), [Figure 103](#), [Figure 104](#) et [Figure 105](#).



**Figure 101** : Spectres de masse MALDI-TOF de l'acide hyaluronique après 30 minutes de réaction avec la hyaluronidase.



**Figure 102** : Spectres de masse MALDI-TOF de l'acide hyaluronique après 1h30 de réaction avec la hyaluronidase.



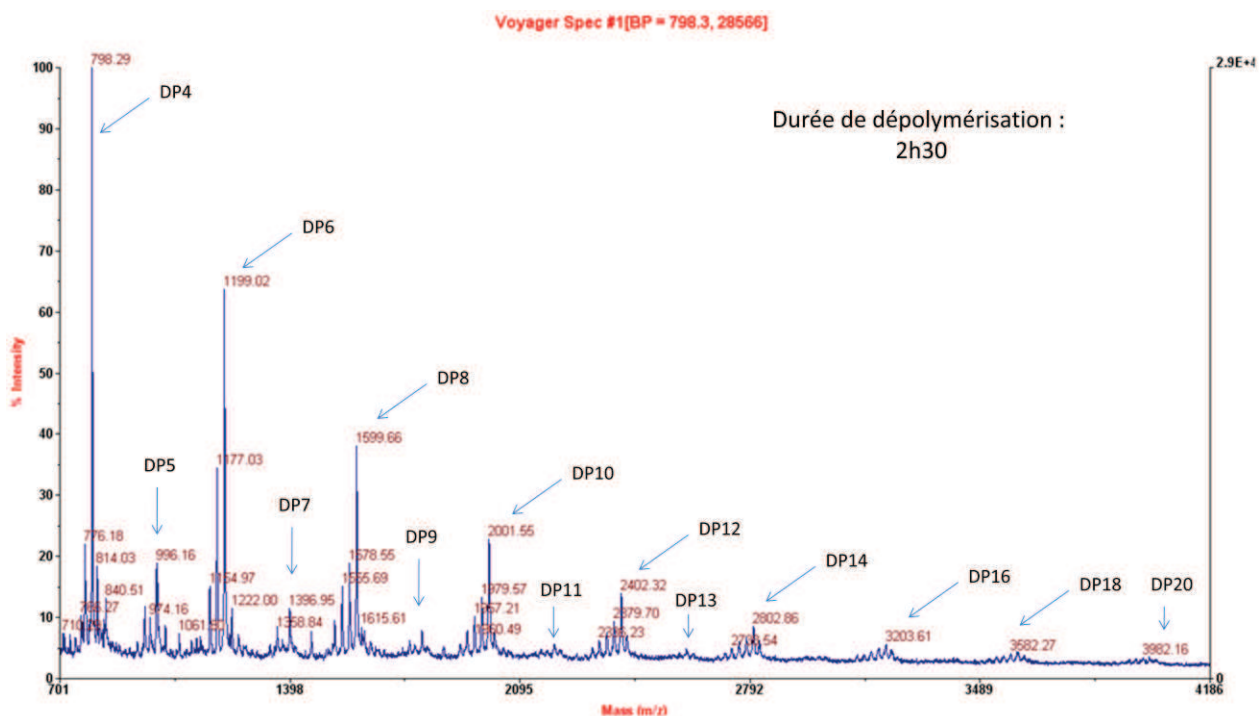


Figure 103 : Spectres de masse MALDI-TOF de l'acide hyaluronique après 2h30 de réaction avec la hyaluronidase.

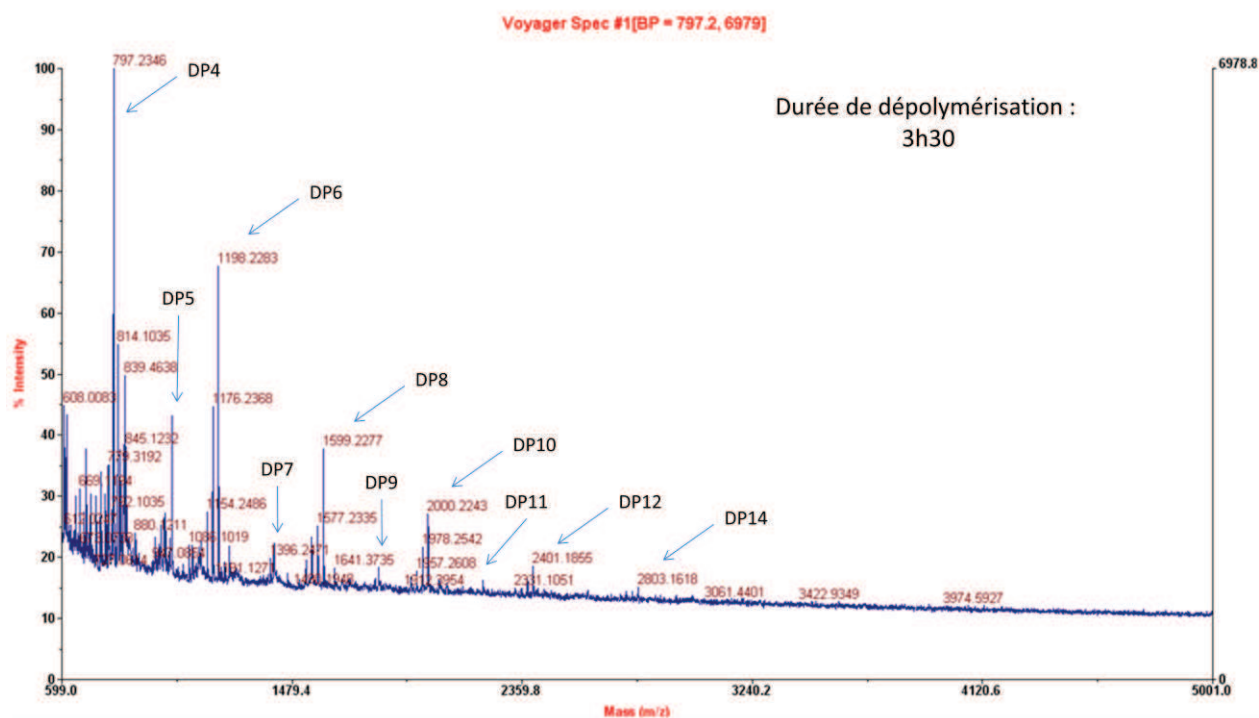
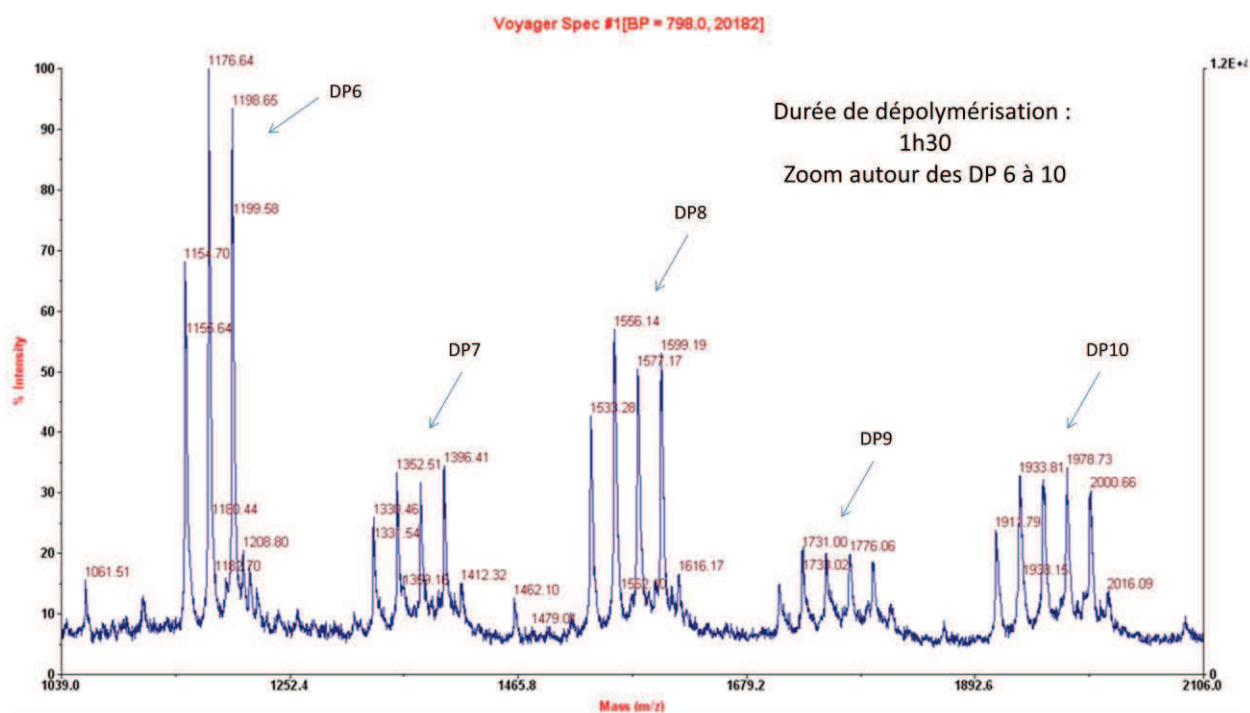


Figure 104 : Spectres de masse MALDI-TOF de l'acide hyaluronique après 3h30 de réaction avec la hyaluronidase.



**Figure 105 :** Spectres de masse MALDI-TOF de l'acide hyaluronique après 1h30 de réaction avec la hyaluronidase. Zoom autour des pics correspondant aux DP 6 à 10 pour l'échantillon après 1h30 de réaction.

Les spectres ont été obtenus en mode réflectron, en polarité négative. La matrice utilisée est HABA/TMG<sub>2</sub> ajoutée au ratio 1/1 avec l'analyte. La tension d'accélération est de 20 kV et le pourcentage de grille est de 70%. Le délai d'extraction est de 300 nsec.

Avant l'ajout de l'enzyme, seul le polysaccharide complet se trouve en solution. On s'attend à observer une hétérogénéité en taille, au cours de la progression de la réaction enzymatique. On retrouve en effet une grande diversité de taille de chaînes de polysaccharides dans chaque échantillon. Pour l'échantillon prélevé après 30 minutes de réaction enzymatique (Figure 101), on observe des pics correspondant à des molécules jusqu'au degré de polymérisation 30 environ. Au fur et à mesure que la réaction se poursuit, les pics correspondant aux oligosaccharides de degré de polymérisation élevé disparaissent, comme on peut le remarquer sur les spectres suivants. Après 1h30 et 2h30 de réaction, les plus longues molécules observées correspondent à un degré de polymérisation de 20 (Figure 102 et Figure 103) tandis qu'après 3h30 de réaction, le degré de polymérisation maximal semble être le DP 14 (Figure 104). On observe également sur chacun des prélèvements des oligosaccharides de degré de polymérisation impair. Ces molécules correspondent à des oligosaccharides ayant perdu une hexosamine (HexA), et avec un ajout d'une acétylation.

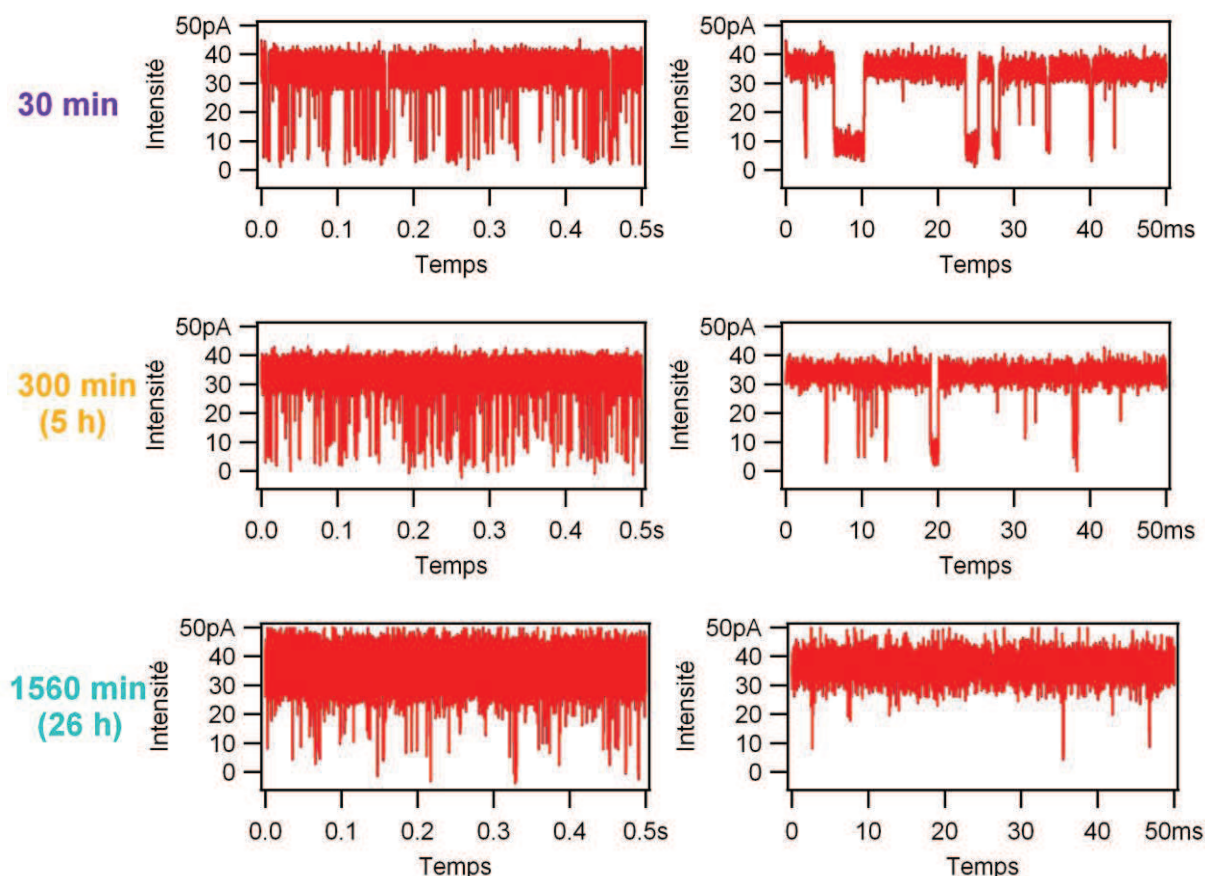
On peut noter que chaque oligosaccharide est représenté par plusieurs pics. Ces pics correspondent chacun à la même molécule mais avec un nombre différent d'adduits sodium reliés. Par exemple, sur la Figure 105, le pic correspondant à l'octasaccharide seul se trouve à m/z 1533.28. Les pics suivant à m/z 1556.14, 1577.17 et 1599.19 correspondent à l'octasaccharide sur lequel sont liés respectivement 1, 2 ou 3 ions sodium.

Nous disposons maintenant des références adéquates pour tester l'étude de la réaction enzymatique par nanopore à l'échelle de la molécule unique.

*Caractérisation par translocation à travers un nanopore*

Les différents prélèvements (Cf. Chapitre IV) au cours de la réaction ont été analysés par mesure électrique à travers un nanopore d'aérollysine. On mesure le courant traversant le pore d'aérollysine. Ces traces de courant présentent de nombreux pics de blocage correspondant au passage des différentes molécules à travers le pore. Chacun de ces pics est caractérisé par son amplitude de blocage du courant, sa fréquence et sa largeur.

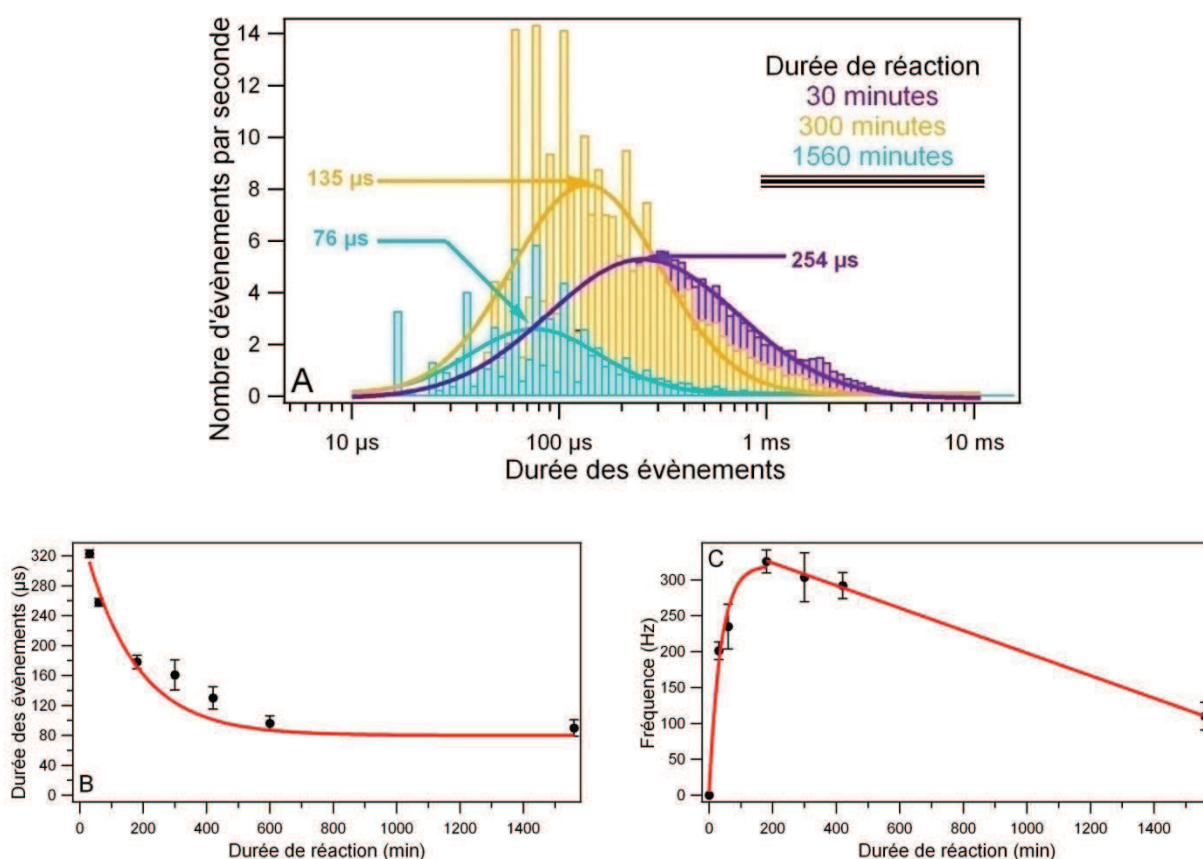
Sur la Figure 106 ci-dessous, sont représentées des traces de courant pour différents échantillons prélevés à différents temps de dépolymérisation enzymatique. On observe une augmentation des fréquences de translocation des chaînes à travers le pore d'aérollysine sur la trace obtenue après 300 minutes de réaction, par rapport à la trace obtenue après seulement 30 minutes de réaction. Après 26 heures de réaction (1560 minutes), la fréquence d'événements diminue fortement (Figure 107, C). De plus, on voit sur la colonne de droite de la Figure 106 que les événements après 30 minutes de réaction sont plus larges que ceux observés après 300 minutes. Ceci est dû à l'avancement de la dépolymérisation de l'acide hyaluronique, produisant des chaînes de polysaccharides de plus en plus courtes, diminuant par la même occasion le temps de translocation à travers le pore.



**Figure 106 :** Traces correspondant au milieu réactionnel obtenu après 30, 300 et 1560 minutes de dépolymérisation enzymatique de l'acide hyaluronique par la hyaluronidase, dans une solution tampon NaAc 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 5,2, T = 37 °C. La détection nanopore est effectuée dans un mélange de 800  $\mu$ L de NaAc 0,1 M, NaCl 0,15 M et 200  $\mu$ L de HEPES 5 mM, KCl 4,5 M, à pH 7,5.

La Figure 107, A montre l'évolution de l'histogramme des durées d'événements pour des échantillons prélevés après 30 minutes, 5h et 26h de réaction. La fréquence ainsi que la durée de translocation des macromolécules présentes dans le mélange est grandement modifiée entre les différents

échantillons, ce qui indique une modification de la taille des chaînes présentes en solution. Ceci est dû à l'activité de dégradation enzymatique par la hyaluronidase, réduisant la taille des chaînes d'acide hyaluronique présentes en solution avant ajout de l'enzyme. On observe une décroissance de la durée moyenne des événements (Figure 107, B) au cours de la réaction, indiquant une diminution du degré de polymérisation des oligosaccharides traversant le pore. Après 30 minutes de réaction, le temps moyen est de  $258 \pm 5 \mu s$ , suggérant la présence en solution d'oligosaccharides de taille supérieure au décassaccharide en moyenne (dont le temps de translocation moyen est de  $90 \pm 3 \mu s$ ). Le temps de translocation des molécules atteint un plateau après 12 ou 13 heures de réaction, à  $80 \pm 12 \mu s$ , indiquant la dépolymérisation complète et l'accumulation de petits oligosaccharides, de taille inférieure à celle du décassaccharide.



**Figure 107 :** (A) Histogramme des durées d'événements du milieu réactionnel après différentes durées de réaction avec la hyaluronidase. (B) et (C) Evolution de la durée (B) et de la fréquence (C) des événements en fonction de la durée de réaction enzymatique. [11]

La fréquence des événements, reliée à la concentration en molécules en solution dans le compartiment d'entrée *cis*, évolue également avec l'avancée de la réaction enzymatique. Avant l'ajout de la hyaluronidase, aucun événement n'est observable, indiquant qu'aucune des molécules du substrat n'est capable de traverser le pore. Ce résultat n'est pas surprenant, le polysaccharide de l'acide hyaluronique ayant une masse moléculaire très élevée ( $1,63 \cdot 10^6$  g/mol), comprenant en moyenne environ 4300 disaccharides. Etant en régime dilué, on peut estimer la taille du diamètre des chaînes d'acide hyaluronique à l'aide de la relation suivante :  $R = a N^{\frac{1}{2}} = 0,35 \times 8600^{\frac{1}{2}} \approx 32,5 \text{ nm}$ . L'énergie libre nécessaire pour étirer une chaîne aussi grande et la confiner dans un nanopore est trop élevée, le confinement de l'acide hyaluronique dans le nanopore n'est donc pas possible dans ces conditions expérimentales [12].

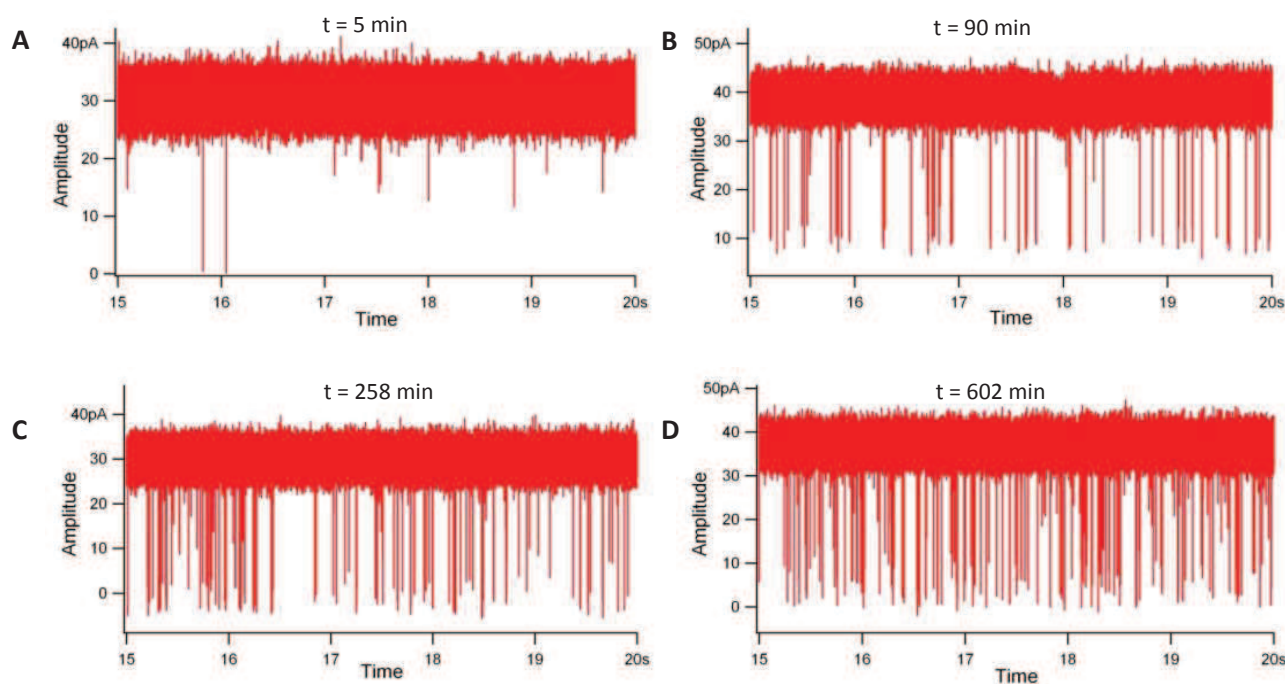


Cependant, après 30 minutes de réaction avec la hyaluronidase, la fréquence des événements s'élève à  $200 \pm 12$  Hz indiquant une augmentation de la concentration en macromolécules capables d'être confinées dans le pore. La fréquence croît à  $260 \pm 10$  Hz après 1h puis  $320 \pm 17$  Hz après 3h de réaction. Au-delà, la fréquence baisse. Cependant, au-delà de 3h, l'histogramme des durées d'événement indique que la réaction n'est pas arrêtée et que la hyaluronidase continue d'agir sur l'acide hyaluronique, entraînant la formation d'oligosaccharides de plus en plus petits, comme en témoigne la diminution des durées d'événements. Cette baisse des fréquences est donc probablement due à la formation majoritaire des tétrasaccharides à partir de ce point de la réaction. La proportion en polysaccharides longs diminue avec l'avancement de la réaction, au profit des oligosaccharides courts, ce qui explique la décroissance des fréquences passées les 3 premières heures de réaction. En effet, ces oligosaccharides étant trop courts, les signaux qu'ils génèrent ne peuvent pas être distingués du bruit électrique comme cela a précédemment été décrit pour la translocation de petits oligosaccharides [13].

Les observations de la détection nanopore sont donc les mêmes que celles obtenues par spectrométrie de masse, à savoir l'avancement de la réaction enzymatique entraînant une augmentation des petits oligosaccharides et une diminution des plus grands oligosaccharides présents en solution.

### III.3.1.b. Suivi de la réaction en temps réel

Après cette première étape au cours de laquelle la réaction enzymatique a été suivie indirectement par nanopore, nous avons réalisé cette réaction directement dans la cellule du nanopore afin d'obtenir un suivi de la réaction en temps réel.



**Figure 108 :** Exemples de traces à différents temps de réaction enzymatique conduite et suivie en temps réel dans le compartiment *cis* du système nanopore. L'étude est effectuée à travers un nanopore d'aérolysine, à une tension appliquée de 70 mV, dans une solution de 800  $\mu$ L de NaAc 0,1 M, 0,15 M NaCl, auxquels sont ajoutés 200  $\mu$ L de HEPES 5 mM, KCl 4,5 M, pH 7,5, T = 21 °C. [HA] = 0,75 mg/mL, [hyaluronidase] = 112 unités.

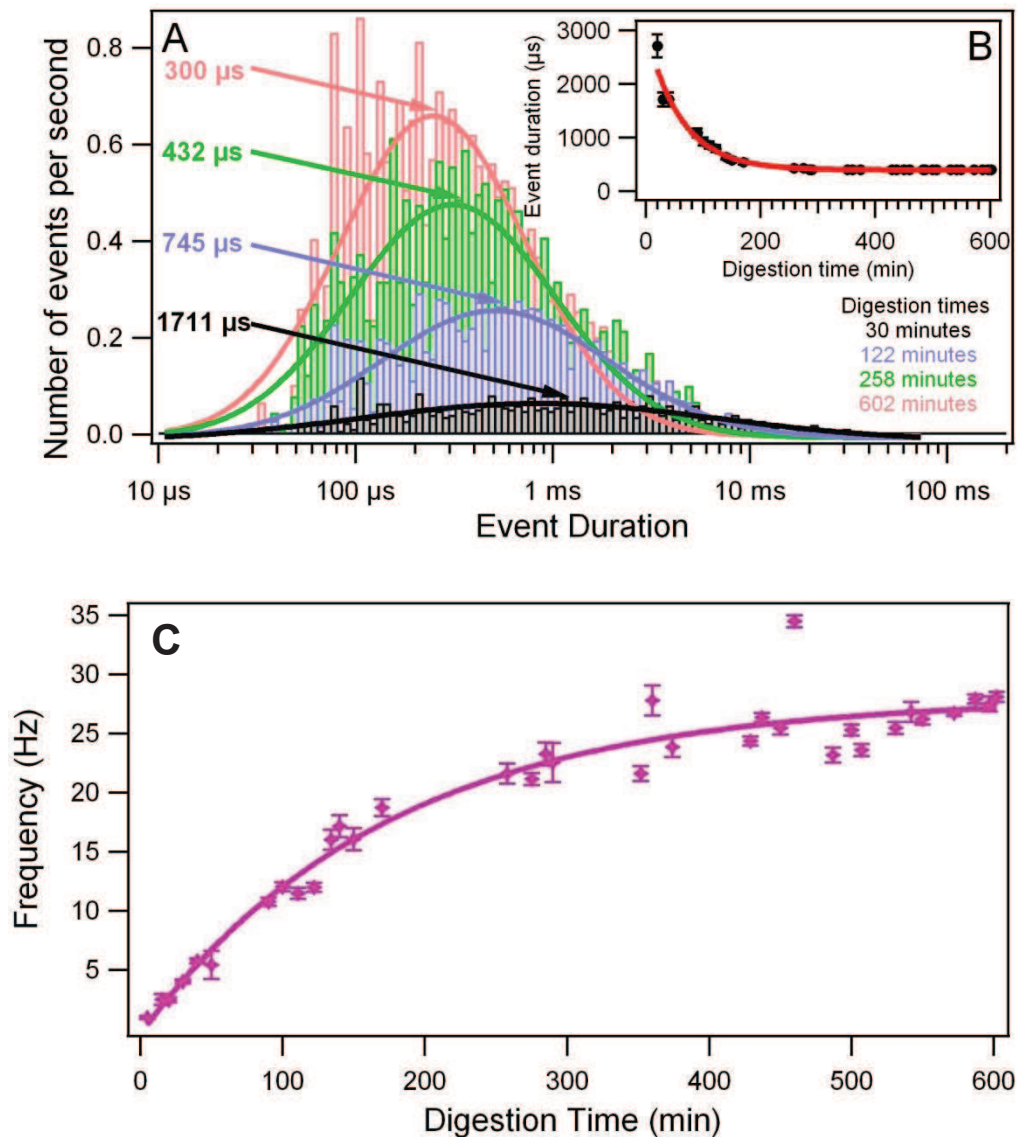
Pour cette réaction enzymatique, l'acide hyaluronique et la hyaluronidase ont tous les deux été introduits dans le compartiment *cis* de la cellule. Les conditions expérimentales ont cependant dû être adaptées pour permettre la détection et l'analyse électrique par nanopore des produits de la dépolymérisation, les solutions utilisées pour les conditions définies comme optimales pour l'enzyme n'étant pas compatibles avec la formation et la stabilité de la membrane lipidique, (Cf. Partie III.3.1.a). Celle-ci a lieu à 21 °C au lieu de 37 °C (notre dispositif nanopore ne permettant pas la régulation de la température des compartiments) et à plus forte concentration molaire (1 M KCl au lieu de 0,15 M NaCl). La [Figure 108](#) montre les traces obtenues à différents temps de réaction enzymatique.

Comme pour le suivi indirect décrit dans la partie précédente ([III.3.1.a](#)), quasiment aucun événement ne fut observable avant l'ajout de la hyaluronidase. Cependant, dès les premières minutes de réaction, des événements très longs (de l'ordre de la milliseconde) commencent à apparaître. Nous n'avons pas pu comparer ce phénomène dans le cas de la méthode indirecte car le premier prélèvement n'a lieu qu'après 30 minutes de réaction enzymatique. Après 5 minutes de réaction analysée en temps réel ([Figure 108, A](#)), la durée de translocation moyenne est d'environ 2700  $\mu$ s. Si on s'en réfère à l'équation  $\tau \approx 11,5 \times DP - 27,33$  reliant le degré de polymérisation à la durée  $\tau$  de translocation des molécules, obtenue pour l'étude des oligosaccharides individuels (Cf. Partie II.3.3), on trouverait un degré de polymérisation moyen des polysaccharides traversant le pore d'environ 240. Cela signifie qu'en étudiant des polysaccharides à travers un nanopore d'aérolysine, nous pourrions analyser des molécules longues d'au moins 120 disaccharides (soit environ 45 kDa) voire même un peu plus étant donné que ce degré de polymérisation obtenu est le résultat d'une moyenne des molécules présentes en solution. Ce degré de polymérisation moyen trouvé par le calcul est cependant sous-estimé car l'équation reliant le degré de polymérisation à la durée de translocation des molécules a été obtenue pour des oligosaccharides linéaires, alors que les polysaccharides plus longs ont tendance à perdre cette linéarité.

La fréquence d'événements continue ensuite à augmenter, parallèlement à une décroissance de la durée moyenne de translocation ([Figure 109](#)) ce qui indique que la hyaluronidase continue à dépolymériser les chaînes d'acide hyaluronique, dont la taille diminue progressivement.

D'après la [Figure 109, C](#), après 10 heures de dépolymérisation, la courbe des fréquences semble se stabiliser. La fréquence d'événements n'évolue donc plus, ce qui signifie que la concentration détectée en macromolécules en solution ne change plus. La courbe représentant la durée moyenne de translocation des molécules à travers le pore ([Figure 109, B](#)) confirme également ceci, la durée moyenne de translocation se stabilisant à  $300 \pm 32 \mu$ s. Cependant, si l'on compare ces résultats avec ceux obtenus dans le cas du suivi indirect de la réaction enzymatique (à 37 °C), on n'observe pas la deuxième partie, décroissante, de l'évolution des fréquences, attribuée au passage de petits oligosaccharides mal détectés ([Figure 107, C](#)). De plus, au maximum des fréquences de passages pour la réaction effectuées à 37 °C, on mesurait des temps de translocation de  $90 \pm 11 \mu$ s, alors que l'on mesure une durée de  $300 \pm 32 \mu$ s au bout de 10h de réaction à 21 °C. A 37 °C, une valeur proche de 300  $\mu$ s (254  $\mu$ s) est obtenue en seulement 30 minutes alors qu'il a fallu 10 heures de réaction dans les conditions d'analyse en temps réel. Ceci est probablement dû à la diminution de l'activité enzymatique dans ces conditions non optimales au fonctionnement de l'enzyme, à faible température ( $T = 21 \text{ °C}$  au lieu de  $T = 37 \text{ °C}$ ) et à haute force ionique ( $|\text{KCl}| = 1\text{M}$  au lieu de  $|\text{NaCl}| = 0,15\text{M}$  et pH 7,5 au lieu de pH 5,2). Ceci est confirmé par une analyse spectrophotométrique de la réaction de dépolymérisation de l'acide hyaluronique dans les deux types de conditions (étudiée plus en détail dans la partie [III.2](#)).





**Figure 109 :** Suivi en temps réel de la réaction de dépolymérisation enzymatique de l'acide hyaluronique. (A) Superposition des histogrammes des durées d'événements. (B) et (C) Courbes d'évolution (B) du temps moyen de translocation des molécules et (C) de la fréquence des événements en fonction de l'avancée de la réaction enzymatique. [11]

Nous avons pu suivre avec succès l'évolution de la réaction enzymatique de l'acide hyaluronique par la hyaluronidase, de deux différentes manières, à travers un nanopore d'aérolysine. Quand la première méthode (réaction effectuée au préalable puis analysée par nanopore) nécessite une préparation en amont des échantillons, la méthode en direct ne nécessite que l'enregistrement d'un fichier d'analyse. Ainsi peut-on rapidement étudier cette réaction, à travers les courbes représentant l'évolution des fréquences des événements ou des durées de translocation des molécules formées.

Cependant, l'inconvénient de la méthode en temps réel réside dans la stabilité de la membrane lipidique. Si elle se casse, il faut la reformer et attendre l'insertion d'un nouveau pore entraînant des courbes incomplètes. De plus, le montage expérimental dont nous disposons ne permettant pas de modifier la température, la réaction a lieu à température ambiante. L'avantage de la méthode en deux temps est pouvoir effectuer la réaction de dépolymérisation à 37 °C dans les conditions optimales pour l'enzyme, et également de figer le milieu réactionnel à n'importe quel moment, par inactivation de l'enzyme en chauffant la solution à 100 °C pendant 1 à 2 minutes [14].

A l'inverse, la méthode en temps réel permet d'analyser à l'évolution de la réaction à chaque instant de la réaction. Elle ne nécessite aucune manipulation complémentaire telle que le prélèvement d'échantillons à différents moments, ou encore le chauffage pour l'inactivation de l'enzyme. Cette méthode est directe et permet d'obtenir des résultats très rapidement et avec très peu de produit.

### **III.3.2. Calcul des concentrations en oligosaccharides d'acide hyaluronique présents en solution, à différents instants de la réaction enzymatique**

A l'aide de l'équation reliant la fréquence d'événements à la concentration, calculée d'après la fréquence de translocation d'un décasaccharide (Cf. Partie II.3.3,  $f = 0,1889 \times C$ ), nous pouvons estimer la concentration en molécules présentes en solution à chaque instant de la réaction enzymatique.

Dans le cas du suivi indirect de la réaction enzymatique (à 37 °C), après 30 minutes de réaction, la fréquence est de  $200 \pm 12$  Hz. Cette fréquence d'événement correspond à une concentration en macromolécules en solution d'environ 1,06 mM (équivalents décasaccharide), sachant que la concentration de départ en substrat était de 3 mg/mL soit 1,84  $\mu$ M. La concentration en molécules en solution a donc augmenté d'un facteur environ égal à 500 depuis l'ajout de l'enzyme en solution. Après 3 heures de réaction, la fréquence monte à  $320 \pm 17$  Hz, ce qui correspond à une concentration environ égale à 1,7 mM (équivalents décasaccharide).

Pour la réaction suivie en temps réel (réalisée à 21 °C), après 10 heures de réaction, la fréquence d'événements observée est de  $28,08 \pm 0,42$  Hz, ce qui correspond à une concentration en solution d'environ 148,65  $\mu$ M alors que la concentration en substrat était initialement de 0,46  $\mu$ M.

On remarque des différences entre les concentrations trouvées dans le cas où la réaction enzymatique est réalisée à 37 °C ou à 21 °C. Ceci est en partie dû au fait que la concentration initiale en substrat est 4 fois inférieure dans le cas où la réaction est suivie en temps réel. Ceci explique en partie les faibles concentrations ainsi calculées. L'autre raison est due à la lenteur de la réaction dans des conditions non optimales pour le fonctionnement de l'enzyme comme décrit précédemment (Partie III.3.1.b).

On peut donc suivre la concentration totale en molécules présentes en solutions à chaque instant. Ces valeurs seront ensuite comparées à celles obtenues dans le cas où la réaction enzymatique est suivie par spectroscopie UV dans la partie III.4, afin de vérifier si ce que l'on mesure est suffisamment précis ou non.

### III.3.3. Etude de la cinétique de la réaction enzymatique

Cette capacité des nanopores à suivre une réaction enzymatique nous a conduits à déterminer les paramètres de la réaction de dépolymérisation de l'acide hyaluronique par la hyaluronidase, selon le modèle de Michaëlis-Menten.

A partir des résultats expérimentaux, on mesure les vitesses initiales pour chaque concentration initiale de substrat  $[S]_0$ , pour une concentration donnée d'enzyme, et on trouve la courbe  $v = f([S]_0)$  (Figure 110, A). L'asymptote horizontale de cette hyperbole (pour les grandes valeurs de  $[S]_0$ ) permet de trouver la valeur de  $v_{\max}$  ainsi que la valeur de  $K_M$  qui est la valeur de  $[S]_0$  lorsque  $v = \frac{v_{\max}}{2}$ .

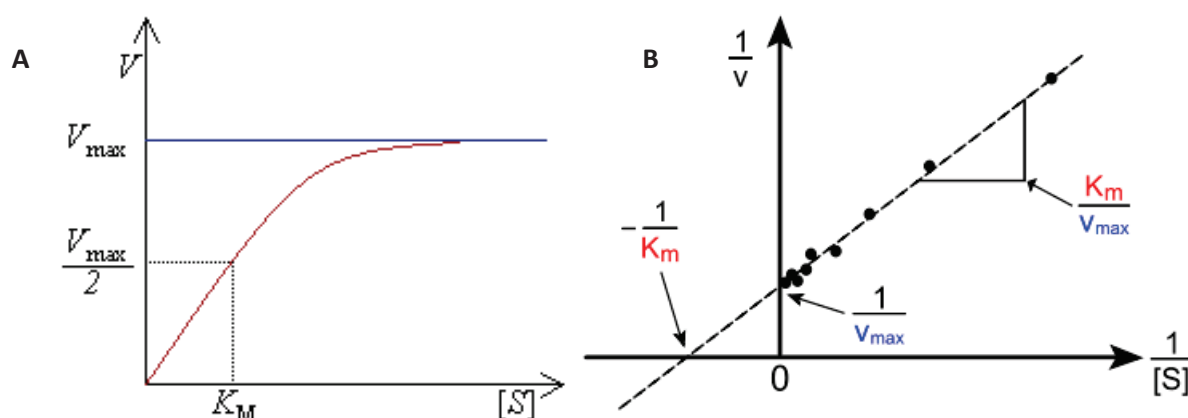
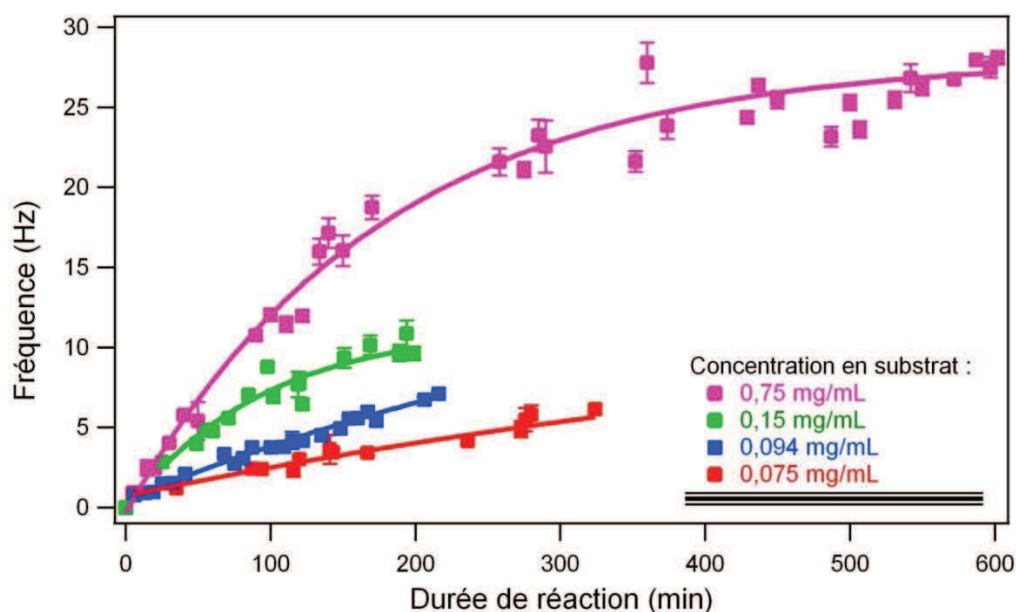


Figure 110 : (A) Représentation hyperbolique de l'équation de Michaëlis-Menten. (B) Représentation de Lineweaver-Burk.

La représentation de Lineweaver-Burk, permet de tracer  $\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{[S]_0}\right) = \frac{K_M}{v_{\max}}\left(\frac{1}{[S]_0}\right) + \frac{1}{v_{\max}}$  (Figure 110, B).

Cette représentation est une droite nous permet de trouver  $\frac{1}{v_{\max}}$  au point où la droite coupe l'axe des ordonnées et l'inverse de la constante de Michaëlis  $\frac{-1}{K_M}$  au point où la droite coupe l'axe des abscisses.

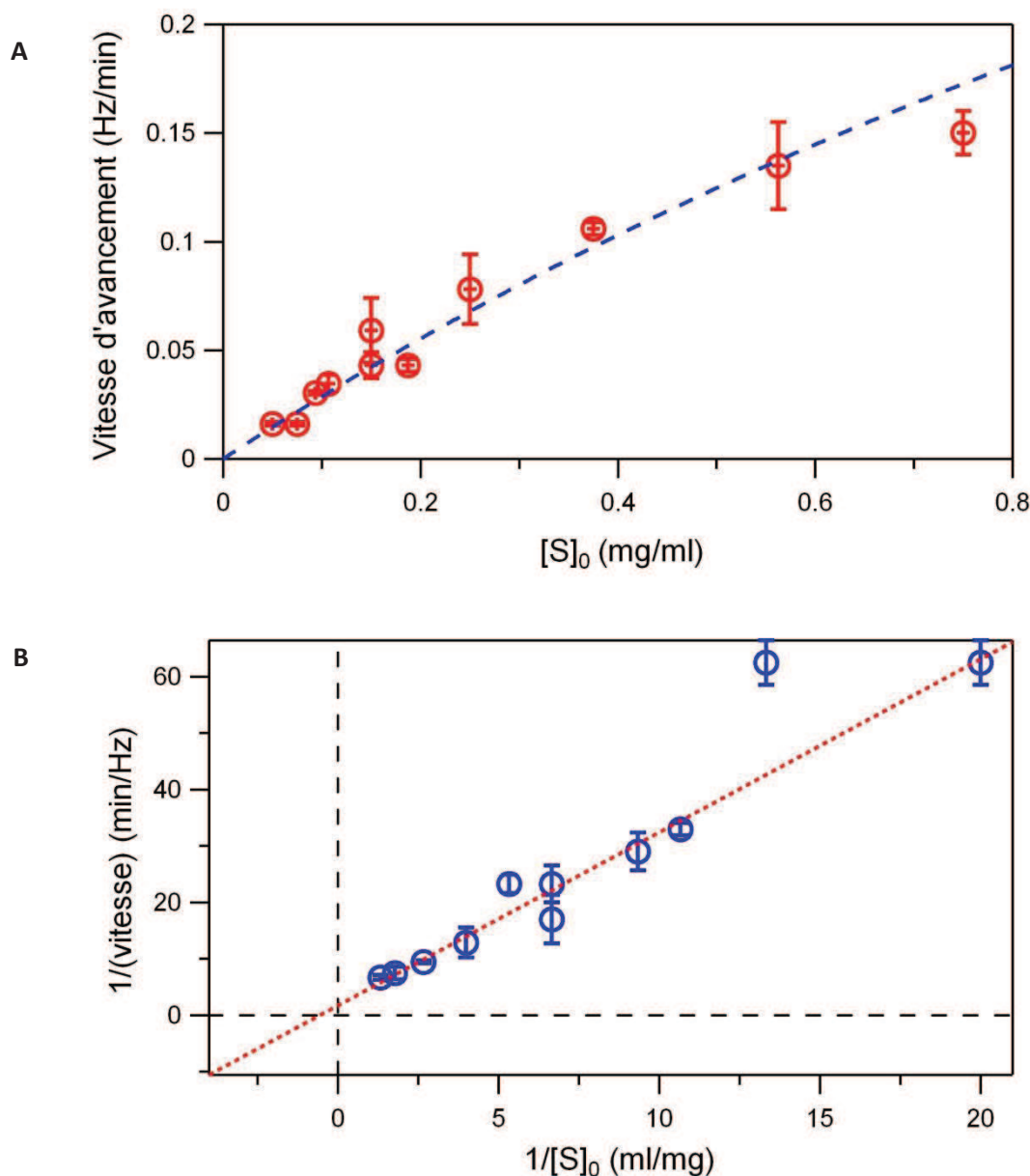
Nous avons donc voulu faire une étude enzymologique plus complète de cette réaction de dépolymérisation de l'acide hyaluronique. Pour cela, nous avons fait varier la concentration de substrat dans le compartiment *cis*. Les courbes donnant les fréquences en fonction de la durée de réaction ont été tracées et superposées pour chacune des concentrations (Figure 111). La fréquence étant proportionnelle à la concentration en molécules en solution, l'évolution des fréquences nous renseigne sur l'évolution des concentrations en molécules à chaque instant de la réaction enzymatique et ce pour chacune des expériences suivantes, faisant varier la concentration en substrat. La pente de la tangente à l'origine nous donne la vitesse initiale  $V_i$  de réaction. La température à laquelle ont eu lieu les expériences est de  $22 \pm 1$  °C. La solution tampon utilisée consiste en un mélange de 800  $\mu\text{L}$  de NaAc 0,1 M, NaCl 0,15 M et 200  $\mu\text{L}$  de HEPES 5 mM, KCl 4,5 M, à pH 7,5.



**Figure 111** : Cinétique enzymatique mesurée à différentes concentrations de substrat, l'acide hyaluronique dans une solution de 800  $\mu\text{L}$  de NaAc 0,1 M, NaCl 0,15 M et 200  $\mu\text{L}$  de HEPES 5 mM, KCl 4,5 M, à pH 7,5.  $\Delta V = 70$  mV.  $T = 21$  °C.

Dans la gamme de concentrations utilisée, plus la concentration en substrat est élevée, plus la réaction est rapide. En traçant chacune de ces vitesses initiales en fonction de la concentration en substrat, il est possible de tracer une courbe du type de Michaelis-Menten (Figure 112, A et B). Les courbes obtenues donnent des résultats similaires à celles des courbes de Michaëlis-Menten classiques (Figure 112, A) et la représentation de Lineweaver-Burk (Figure 112, B) est valable pour des faibles variations de concentrations en glycosaminoglycanes [5].

Pour nos méthodes d'analyses par nanopore, la méthode la plus précise est la représentation de Lineweaver-Burk car dans les deux cas, les courbes tracées dépendent beaucoup des premiers points (ceux proches de l'origine). Pour la représentation de Michaëlis-Menten, les premiers points correspondent à des concentrations faibles en substrat. Les fréquences d'événements que nous détectons sont alors plus faibles et donc moins précises. À l'inverse, la représentation de Lineweaver-Burk est une droite traçant dont les premiers points (donc pour  $1/[S]$  faibles) correspondent aux concentrations en substrat les plus élevées. À ces concentrations-là, les fréquences d'événements sont plus élevées et donc plus précises.



**Figure 112** : Représentations (A) de Michaëlis-Menten et (B) de Lineweaver-Burk. Ces deux représentations nous permettent de calculer les constantes associées à cette réaction enzymatique telles que la vitesse maximale de réaction ou la constante de Michaëlis  $K_M$ .

Après avoir tracé les points en fonction de la représentation de Lineweaver-Burk (Figure 112, B) et en faisant une régression linéaire, on retrouve  $K_M = 0,913 \pm 0,246$  mg/mL =  $0,56 \pm 0,15$   $\mu$ M et  $v_{max} = 0,40 \pm 0,11$  (événements/s)/min. On vérifie les valeurs de  $K_M$  et  $v_{max}$  obtenues avec la représentation de Michaëlis-Menten, sur la Figure 112, A. On trouve  $K_M = 0,99 \pm 0,27$  mg/mL =  $0,607 \pm 0,167$   $\mu$ M et  $v_{max} = 0,36 \pm 0,07$  (événements/s)/min, soit des valeurs similaires quelle que soit la représentation utilisée. A l'aide de la relation liant la fréquence d'événements à la concentration ( $f = 0,1889 \times C$ ) trouvée dans la partie II.3.3, on sait qu'une fréquence de 0,40 Hz correspond à une concentration de  $C = \frac{f}{0,1889} = \frac{0,40}{0,1889} = 2,12$   $\mu$ M et qu'une fréquence de 0,36 Hz correspond à 1,91  $\mu$ M. Les  $v_{max}$  trouvées ci-dessus sont donc respectivement  $v_{max} = 2,12$   $\mu$ M/min et  $v_{max} = 1,91$   $\mu$ M/min.

Ces valeurs de  $K_M$  sont légèrement supérieures à celles trouvées dans la littérature, situées autour de 0,45 mg/mL [15, 16] voire même à des valeurs inférieures (0,14 mg/mL) [17]. Ceci peut néanmoins s'expliquer par le fait que le  $K_M$  est fortement dépendant de la taille de l'acide hyaluronique utilisé [18]. Les différentes valeurs restent malgré tout du même ordre de grandeur.

La technique nanopore nous permet donc de suivre la cinétique d'une réaction enzymatique, en temps réel, à l'échelle de la molécule unique, nous permettant d'obtenir une estimation de la distribution en taille des produits de la réaction, provenant de la distribution des temps de passage. Il est également possible de calculer les paramètres cinétiques de la réaction, tels que la constante de Michaelis  $K_M$ , ou la vitesse maximale de réaction tel que cela a été décrit ci-dessus.

### III.3.4. Réaction enzymatique analysée à travers un pore d' $\alpha$ -hémolysine

La réaction de dépolymérisation de l'acide hyaluronique catalysée par la hyaluronidase, a également été analysée à travers le nanopore d' $\alpha$ -hémolysine. Auparavant, aucun des oligosaccharides du DP 6 au DP 10 de l'acide hyaluronique n'a été détecté à travers le pore d' $\alpha$ -hémolysine (Cf. partie II.7.1). Nous avons utilisé la réaction enzymatique pour obtenir et analyser des chaînes d'acide hyaluronique de tailles supérieures à celle du décacaccharide.

La réaction enzymatique a été menée en temps réel dans la cellule nanopore, à température ambiante ( $21 \pm 1$  °C). Les conditions expérimentales sont les mêmes que pour la réaction enzymatique analysée en temps réel à travers un pore d'aérolysine : une solution tampon composée d'un mélange de 200  $\mu$ L de HEPES 5 mM, KCl 4,5 M à laquelle sont ajoutés 800  $\mu$ L de NaAc 0,1 M, NaCl 0,15 M, à pH 7,5. L'acide hyaluronique est ajouté en solution pour obtenir une concentration finale de 0,75 mg/mL et dès la formation d'un pore d' $\alpha$ -hémolysine, 112 unités (0,075 mg/mL) de hyaluronidase sont ajoutées.

Avant l'ajout de l'enzyme, quelques événements étaient observables, indiquant que le polysaccharide complet semble être détectable en utilisant un pore d' $\alpha$ -hémolysine, estimé plus large que le pore d'aérolysine. Après ajout de l'enzyme (112 unités), la fréquence augmente rapidement jusqu'à atteindre un maximum de  $21 \pm 0,85$  Hz après 37 minutes de réaction (Figure 114). Au-delà, la fréquence des événements commence à chuter jusqu'à devenir nulle après 10 heures de réaction.



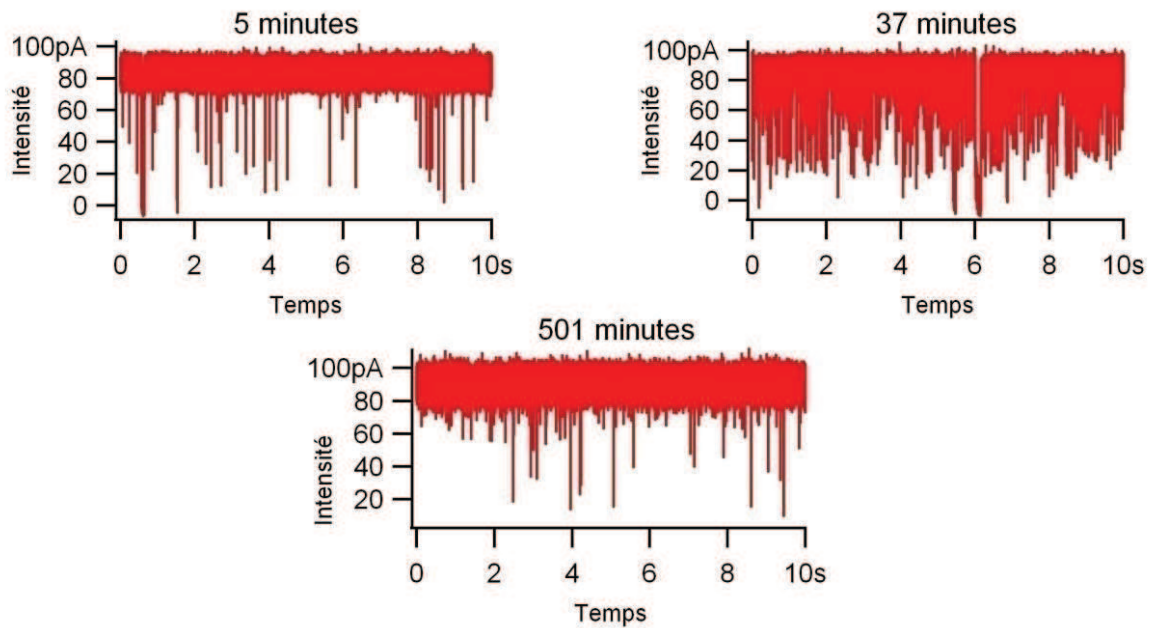


Figure 113 : Traces à différents temps de réaction enzymatique à travers un pore d' $\alpha$ -hémolysine.

Au départ, avant ajout de l'enzyme, très peu d'événements sont visibles, possiblement en raison d'une barrière d'énergie de confinement élevée due à la grande taille des chaînes d'acide hyaluronique. Cela confirme que les différentes chaînes de l'acide hyaluronique (quel que soit leur degré de polymérisation) n'interagissent pas de la même façon avec le pore d' $\alpha$ -hémolysine qu'avec le pore d'aérolysine, les deux nanopores ayant des structures, taille et répartition de leurs charges différentes. En effet, aucun événement n'était observable avant ajout de la hyaluronidase lorsque la réaction était analysée avec le pore d'aérolysine.

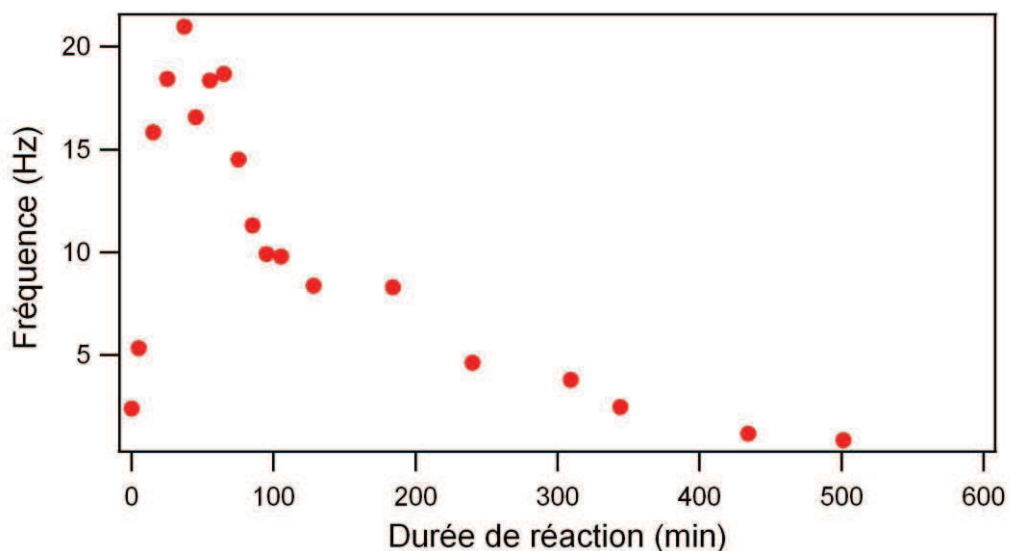


Figure 114 : Courbe d'évolution de la fréquence d'événements des molécules de l'acide hyaluronique (0,75 mg/mL) en fonction de la durée de réaction avec la hyaluronidase (112 unités), dans une solution de 800  $\mu$ L de NaAc 0,1 M, NaCl 0,15 M et 200  $\mu$ L de HEPES 5 mM, KCl 4,5 M, à pH 7,5.  $\Delta V$  = 100 mV.  $T$  = 21 °C.

Dès les premières minutes de réaction après ajout de la hyaluronidase, la proportion de ces chaînes capables de traverser le pore augmente rapidement, ces molécules étant plus petites que le polysaccharide

complet (Figure 113). Après 37 minutes de réaction, la fréquence d'événements détectés chute rapidement (Figure 114). Les chaînes sont de moins en moins nombreuses à être détectées lors de leur entrée dans le pore car elles deviennent trop petites pour que leur translocation à travers le pore soit observable. Les petites molécules traversent probablement quand même le pore, mais trop rapidement pour pouvoir être observées.

La translocation rapide des molécules à travers le pore d' $\alpha$ -hémolysine est confirmée par l'analyse des durées d'événements (Figure 115). Dès le début, les molécules traversant le pore ont une durée de translocation moyenne de  $325 \pm 13$   $\mu$ s puis de  $250 \pm 12$   $\mu$ s respectivement avant puis 5 minutes après ajout de la hyaluronidase. Par comparaison avec les expériences à travers l'aérolysine, après 5 minutes de réaction, le temps moyen de translocation est de 2700  $\mu$ s, soit un temps plus de 10 fois plus long que celui à travers l' $\alpha$ -hémolysine. Si ce rapport est toujours le même quelles que soient les conditions expérimentales et la taille du polysaccharide traversant le pore, une molécule de dp 10 traversant le pore d'aérolysine en  $90 \pm 3$   $\mu$ s devrait traverser le pore d' $\alpha$ -hémolysine en moins de 10  $\mu$ s. Ceci pourrait fournir une explication quant au fait que nous n'ayons pas été capables de les détecter avec le pore d' $\alpha$ -hémolysine, notre appareillage ne nous permettant pas l'observation correcte de molécules traversant le pore en moins de 40  $\mu$ s [19, 20].

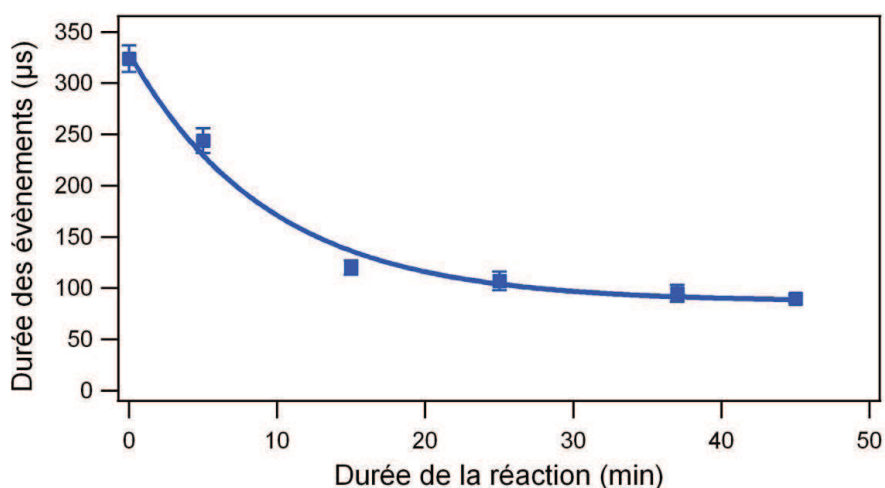


Figure 115 : Durées des événements en fonction de la durée de la réaction enzymatique dans une solution de 800  $\mu$ L de NaAc 0,1 M, NaCl 0,15 M et 200  $\mu$ L de HEPES 5 mM, KCl 4,5 M, à pH 7,5.  $\Delta V = 100$  mV.  $T = 21$  °C.

Malgré des premiers résultats nous laissant penser que les oligosaccharides purifiés de l'acide hyaluronique n'étaient pas détectés lors de leur translocation à travers le pore d' $\alpha$ -hémolysine, nous avons réussi à observer, à l'aide de la dépolymérisation enzymatique de l'acide hyaluronique, des événements correspondant à des chaînes de longueurs largement plus grande que celles des oligosaccharides dont nous disposons, confirmant que ces molécules peuvent bien traverser le pore d' $\alpha$ -hémolysine. Nous avons également pu effectuer des comparaisons entre les pores d' $\alpha$ -hémolysine et d'aérolysine. A partir des données obtenues lors de l'analyse de la réaction enzymatique à travers ces deux pores, les chaînes de polyélectrolytes anioniques de l'acide hyaluronique traversent le pore d' $\alpha$ -hémolysine plus de 10 fois plus rapidement que celui de l'aérolysine. Ceci est peut-être dû à la différence de charge globale des deux pores, le pore d'aérolysine étant apparemment chargé négativement à pH 7,5, comme les molécules, des répulsions ralentissent peut-être les oligosaccharides alors qu'ils sont plus facilement entraînés dans le pore d' $\alpha$ -hémolysine par des interactions attractives, le pore d' $\alpha$ -hémolysine possédant *a priori* une charge globale positive à pH 7,5 [21].

### III.4. Comparaison des données obtenues par nanopore et par spectroscopie UV

Les estimations précédentes montrent que l'on observe les mêmes évolutions en suivant la réaction enzymatique par nanopore et par spectroscopie UV. Le nombre de chaînes d'acide hyaluronique en solution, produites par la réaction de dépolymérisation par la hyaluronidase après 10 heures de réaction à 21 °C, dans les conditions nanopores, est atteint en moins de 30 minutes de réaction à 37 °C, dans les conditions optimales de fonctionnement de l'enzyme. Nous retrouvons les mêmes durées avec les deux techniques. Ceci tend à montrer que le suivi enzymatique par nanopore semble très bien adapté et prometteur, étant en plus réalisé en temps réel contrairement à la méthode colorimétrique qui nécessite de mélanger l'échantillon à un réactif (WST-1) puis à le chauffer pendant 1h avant de pouvoir en mesurer la densité optique. Ces résultats confirment les résultats de Zhao *et al.* [2] avec des peptides et généralisent cette technique à l'étude de la cinétique de réactions enzymatiques en général.

Cependant, l'inconvénient du suivi par nanopore comparé à la spectroscopie UV, est que les très petits oligosaccharides (inférieurs au dp 8) sont mal résolus et souvent non détectés, ce qui cause des imprécisions concernant le suivi enzymatique en fin de la réaction, moment où ces petits oligosaccharides sont majoritaires. De plus, les molécules trop grosses, comme le polysaccharide de l'acide hyaluronique avant dépolymérisation, n'entrent pas dans le pore et ne sont donc pas plus détectées. Les fréquences d'événements observées sont alors sous-estimées comme on peut le voir en comparant les concentrations en molécules calculées à certains moments par ces deux différentes méthodes. En effet, comme on l'a vu ci-dessus (Partie III.2), après 30 minutes de réaction enzymatique à 37 °C, à faible force ionique, la concentration des chaînes d'acide hyaluronique en solution mesurée par spectroscopie UV est d'environ 4,06 mM. Après 10 heures de réaction, dans les conditions de l'analyse nanopore en temps réel (à 21 °C), la concentration en molécules en solution trouvée par spectroscopie UV est d'environ 3,71 mM. Par comparaison, les valeurs trouvées par l'analyse nanopore correspondant à ces deux points sont 1,06 mM et 148,65 µM, respectivement. On trouve donc un facteur 4 entre les concentrations calculées résultant de l'analyse nanopore et celles trouvées par spectroscopie UV, après 30 minutes de réaction et même un rapport d'environ 25 dans le cas où la réaction est faite à 21 °C dans les conditions nanopore (Cf. [Tableau 5](#)). Ces faibles concentrations trouvées dans le cas où l'analyse est faite par nanopore sont dues au fait que les chaînes trop courtes ne sont pas détectées, comme expliqué au début de ce paragraphe. Le nanopore se comporte donc comme un « filtre passe-bande » et ne permet d'analyser que les molécules se trouvant dans la bonne gamme de taille, environ entre les molécules de dp 10 et celles de dp 240 (Cf. [partie III.3.1.b](#)).

	21 °C		37 °C	
	Nanopore	UV-Visible	Nanopore	UV-Visible
Concentration initiale	0,46 µM		1,84 µM	
Après 30 minutes			1,06 mM	4,06 mM
Après 10 heures	148,65 µM	3,71 mM		

**Tableau 5 : Comparaison des concentrations en chaînes d'acide hyaluronique en solution à différents temps de réaction (30 minutes et 10 heures), à 21 et à 37 °C, analysé par nanopore ou par spectroscopie UV-Visible.**

### III.5. Conclusion

Les expériences étudiées dans ce chapitre ont permis de mettre au point une première application de la technique d'analyse par nanopore, au suivi et à l'étude de la cinétique d'une réaction enzymatique. Nous avons analysé différents échantillons provenant d'un milieu réactionnel au sein duquel l'acide hyaluronique a été dépolymérisé par la hyaluronidase.

Deux techniques ont été utilisées. La première fut l'analyse nanopore de manière indirecte, pour laquelle la réaction enzymatique a été réalisée en amont et des échantillons ont été prélevés à différents temps de réaction. La seconde technique consista en l'analyse en temps réel de cette réaction enzymatique, conduite directement dans le compartiment nanopore, permettant ainsi une estimation immédiate des distributions en taille des molécules présentes en solution. Ces deux expériences montrent une augmentation de la fréquence des événements en fonction de l'avancée de la réaction enzymatique, ainsi qu'une décroissance des durées de translocation. L'augmentation des fréquences nous renseigne sur l'augmentation du nombre de molécules présentes en solution, comme cela était prévisible, la hyaluronidase effectuant un clivage des liaisons  $\beta(1\rightarrow4)$  de l'acide hyaluronique, elle augmente le nombre de molécules. Ce clivage diminue également la longueur des chaînes présentes en solution, ceci est également observé, d'après la diminution des temps de translocation.

Après avoir correctement effectué le suivi de la réaction de dépolymérisation, celle-ci a été étudiée en faisant varier la concentration en substrat (l'acide hyaluronique) pour une même concentration d'enzyme (la hyaluronidase). Les fréquences d'événements ont été mesurées et nous ont permis de déterminer les paramètres cinétiques de la réaction,  $K_M$  et  $v_{max}$ , dont les valeurs sont proches de celles trouvées dans la littérature. L'étude a de plus été validée par comparaison avec un suivi classique par spectroscopie UV-Visible.

### III.6. Références bibliographiques

1. Kasianowicz, J.J., Brandin, E., Branton, D., and Deamer, D.W., *Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 13770-13773.
2. Zhao, Q., de Zoysa, R.S., Wang, D., Jayawardhana, D.A., and Guan, X., *Real-time monitoring of peptide cleavage using a nanopore probe*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(18): p. 6324-5.
3. Macrae, M.X., Blake, S., Jiang, X., Capone, R., Estes, D.J., Mayer, M., and Yang, J., *A Semi-Synthetic Ion Channel Platform for Detection of Phosphatase and Protease Activity*. ACS Nano, 2009. **3**(11): p. 3567-3580.
4. Kreil, G., *Hyaluronidases — a group of neglected enzymes*. Protein Science, 1995. **4**(9): p. 1666-1669.
5. Ernst, S., Langer, R., Cooney, C.L., and Sasisekharan, R., *Enzymatic degradation of glycosaminoglycans*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1995. **30**(5): p. 387-444.
6. Tam, Y.C. and Chan, E.C., *Purification and characterization of hyaluronidase from oral Peptostreptococcus species*. Infect Immun, 1985. **47**(2): p. 508-13.
7. Yamagata, T., Saito, H., Habuchi, O., and Suzuki, S., *Purification and Properties of Bacterial Chondroitinases and Chondrosulfatases*. Journal of Biological Chemistry, 1968. **243**(7): p. 1523-1535.
8. Stern, R. and Jedrzejewski, M.J., *Hyaluronidases : Their Genomics, Structures, and Mechanisms of Action*. Chemical Reviews, 2006. **106**(3): p. 818-839.
9. Stern, R., Kogan, G., Jedrzejewski, M.J., and Soltés, L., *The many ways to cleave hyaluronan*. Biotechnology Advances, 2007. **25**(6): p. 537-557.
10. Böckmann, R.A., Hac, A., Heimburg, T., and Grubmüller, H., *Effect of Sodium Chloride on a Lipid Bilayer*. Biophysical Journal, 2003. **85**(3): p. 1647-1655.
11. Fennouri, A., Przybylski, C., Pastoriza-Gallego, M., Bacri, L., Auvray, L., and Daniel, R., *Single Molecule Detection of Glycosaminoglycan Hyaluronic Acid Oligosaccharides and Depolymerization Enzyme Activity Using a Protein Nanopore*. ACS Nano, 2012. **6**(11): p. 9672-9678.
12. Movileanu, L., Cheley, S., and Bayley, H., *Partitioning of individual flexible polymers into a nanoscopic protein pore*. Biophys J, 2003. **85**(2): p. 897-910.
13. Bacri, L., Oukhaled, A., Hémon, E., Bassafoula, F.B., Auvray, L., and Daniel, R., *Discrimination of neutral oligosaccharides through a nanopore*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011. **412**(4): p. 561-564.
14. Powell, A.K., Ahmed, Y.A., Yates, E.A., and Turnbull, J.E., *Generating heparan sulfate saccharide libraries for glycomics applications*. Nat Protoc, 2010. **5**(5): p. 821-33.
15. Vercruyse, K.P., Lauwers, A.R., and Demeester, J.M., *Kinetic investigation of the action of hyaluronidase on hyaluronan using the Morgan-Elson and neocuproine assays*. Biochem J, 1995. **310** ( Pt 1): p. 55-9.
16. He, D., Zhou, A., Wei, W., Nie, L., and Yao, S., *A new study of the degradation of hyaluronic acid by hyaluronidase using quartz crystal impedance technique*. Talanta, 2001. **53**(5): p. 1021-1029.
17. Tam, Y.C. and Chan, E.C., *Purification and characterization of hyaluronidase from oral Peptostreptococcus species*. Infection and Immunity, 1985. **47**(2): p. 508-513.
18. Deschrevel, B., Tranchepain, F., and Vincent, J.C., *Chain-length dependence of the kinetics of the hyaluronan hydrolysis catalyzed by bovine testicular hyaluronidase*. Matrix Biol, 2008. **27**(5): p. 475-86.
19. Oukhaled, A., Bacri, L., Pastoriza-Gallego, M., Betton, J.-M., and Pelta, J., *Sensing Proteins through Nanopores: Fundamental to Applications*. ACS Chemical Biology, 2012.
20. Pedone, D., Firnkes, M., and Rant, U., *Data analysis of translocation events in nanopore experiments*. Anal Chem, 2009. **81**(23): p. 9689-94.
21. Cozmuta, I., O'Keeffe, J.T., Bose, D., and Stolc, V., *Hybrid MD-Nernst Planck model of alpha-hemolysin conductance properties*. Molecular Simulation, 2005. **31**(2-3): p. 79-93.





---

## IV. Chapitre 4 : Matériels et méthodes

---

<b>IV.1.</b>	<b><i>Matériels et réactifs.....</i></b>	<b><i>175</i></b>
<b>IV.2.</b>	<b><i>Montage expérimental pour les expériences nanopores .....</i></b>	<b><i>178</i></b>
<b>IV.3.</b>	<b><i>Conditions expérimentales pour la mesure du transport à travers un nanopore.....</i></b>	<b><i>181</i></b>
<b>IV.4.</b>	<b><i>Traitement du signal obtenu lors des expériences nanopore.....</i></b>	<b><i>182</i></b>
<b>IV.5.</b>	<b><i>Analyse MS des oligosaccharides ayant traversé le nanopore.....</i></b>	<b><i>184</i></b>
<b>IV.6.</b>	<b><i>Réaction enzymatique suivie par spectroscopie UV-Visible .....</i></b>	<b><i>189</i></b>
<b>IV.7.</b>	<b><i>Références bibliographiques .....</i></b>	<b><i>190</i></b>



## IV.1. Matériels et réactifs

### IV.1.1. Oligosaccharides d'acide hyaluronique et d'héparine

Les oligosaccharides de l'acide hyaluronique (hyaluronic acid sodium salt from *Streptococcus equi*, Sigma) ont été obtenus par dépolymérisation enzymatique par la hyaluronidase de testicules bovines (E.C. 3.2.1.35, Sigma) [1] (Cf. partie IV.3.2). Les produits de la dégradation ont été séparés à l'aide d'une colonne Bio-Gel P6 (Bio-Rad, 5 x 100 cm) équilibrée avec  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,2 M (pH 8,3), à un débit de 1 mL/min. L'élution a été faite en utilisant la même solution tampon, suivie par la détection par réfraction (R1-71, Merck). Chaque fraction d'oligosaccharides, du tétra- au décасaccharide, a été lyophilisée en deux étapes puis suspendue dans de l'eau ultrapure (Milli-Q, Millipore, Milford, USA).

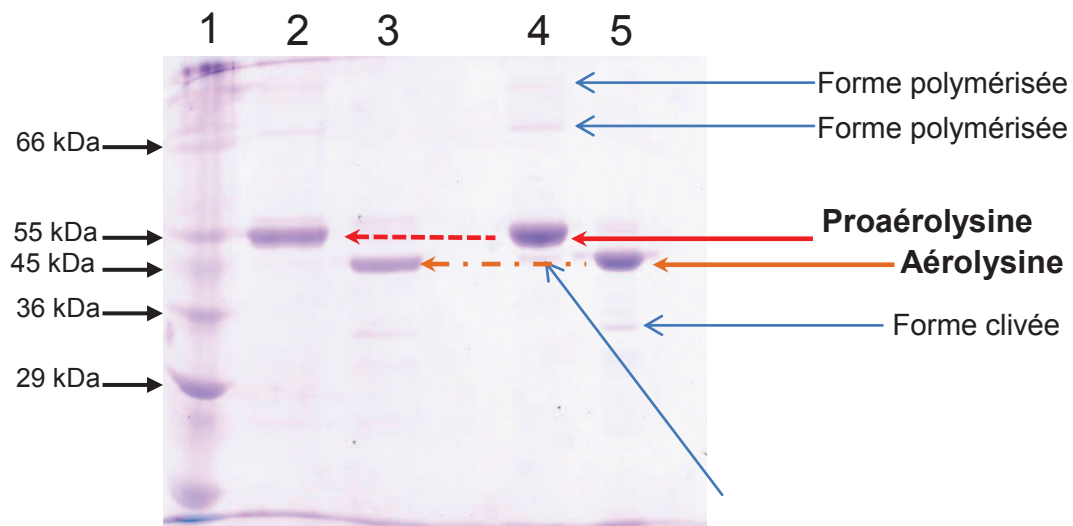
Ces oligosaccharides ont d'abord été étudiés à la concentration de 1 mM mais, à la suite des expériences déterminant le domaine de détection des macromolécules à travers un nanopore, la concentration a été réduite à 100  $\mu\text{M}$  voire 25  $\mu\text{M}$  dans certains cas. Cependant, certaines expériences ont nécessité des concentrations un peu plus importantes (2 à 3 fois plus élevées), dans le cas où aucun événement de translocation n'était observé (par exemple pour les oligosaccharides d'héparine à travers les deux pores ou les oligosaccharides de l'acide hyaluronique à travers le pore d' $\alpha$ -hémolysine).

### IV.1.2. Canaux protéiques

L' $\alpha$ -hémolysine est obtenue par une solution commerciale (Sigma-Aldrich, H9395). A l'opposé, l'aérolysine est produite sous la forme de proaérolysine au laboratoire par Manuela Pastoriza-Gallego de façon recombinante [2, 3]), à partir de la solution obtenue par Juan Pelta auprès de Françoise Gisou Van der Goot [4-6].

#### Vérification de la pureté de la préparation de l'aérolysine

L'aérolysine est produite sous la forme de proaérolysine qui doit être activée par protéolyse catalysée par la trypsine en solution. Le contrôle de cette activation par la trypsine se fait par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide. La [Figure 116](#) montre un gel d'électrophorèse à 10%. Dans chacun des puits (les colonnes numérotées de 1 à 5) est introduit un composé à analyser. Le puits n°1 contient des marqueurs de poids. Les puits n°2 et 4 contiennent deux différentes préparations de proaérolysine et les puits n°3 et 5 contiennent ces deux préparations de proaérolysine activées par la trypsine. Sur les puits n°2 et 4 on trouve une bande à environ 55 kDa, qui correspond à la masse molaire attendue pour la proaérolysine [2] et les puits n°3 et 5 présentent des bandes aux alentours de 45 kDa, correspondant à l'heptamère d'aérolysine.



1: Marqueur poids moléculaire Sigma S8445  
 2: Proaérolysine, préparation du 5.09.11, 10  $\mu$ L  
 Activation avec trypsine 0.36  $\mu$ M final  
 4: Proaérolysine, préparation du 08.10.10, 2  $\mu$ L  
 Activation avec trypsine 0.36  $\mu$ M final

**Figure 116 :** Gel d'électrophorèse permettant de vérifier l'activation de la proaérolysine pour former l'aérolysine.

Les analyses effectuées en spectrométrie de masse MALDI-TOF confirment les résultats obtenus avec les gels d'électrophorèse (Figure 117).

La Figure 117, A montre la présence d'un pic à environ 53 kDa, caractéristique de la présence de proaérolysine en solution. La Figure 117, B montre un pic à environ 46 kDa caractéristique de l'aérolysine indiquant que la proaérolysine a été activée par la trypsine, formant de l'aérolysine. De plus, il n'y a plus aucun pic à 53 kDa, montrant que la proaérolysine a été totalement activée par la trypsine. Le pic présent autour de 70 kDa n'est cependant pas identifié mais pourrait correspondre à un complexe formé par la trypsine et la proaérolysine.

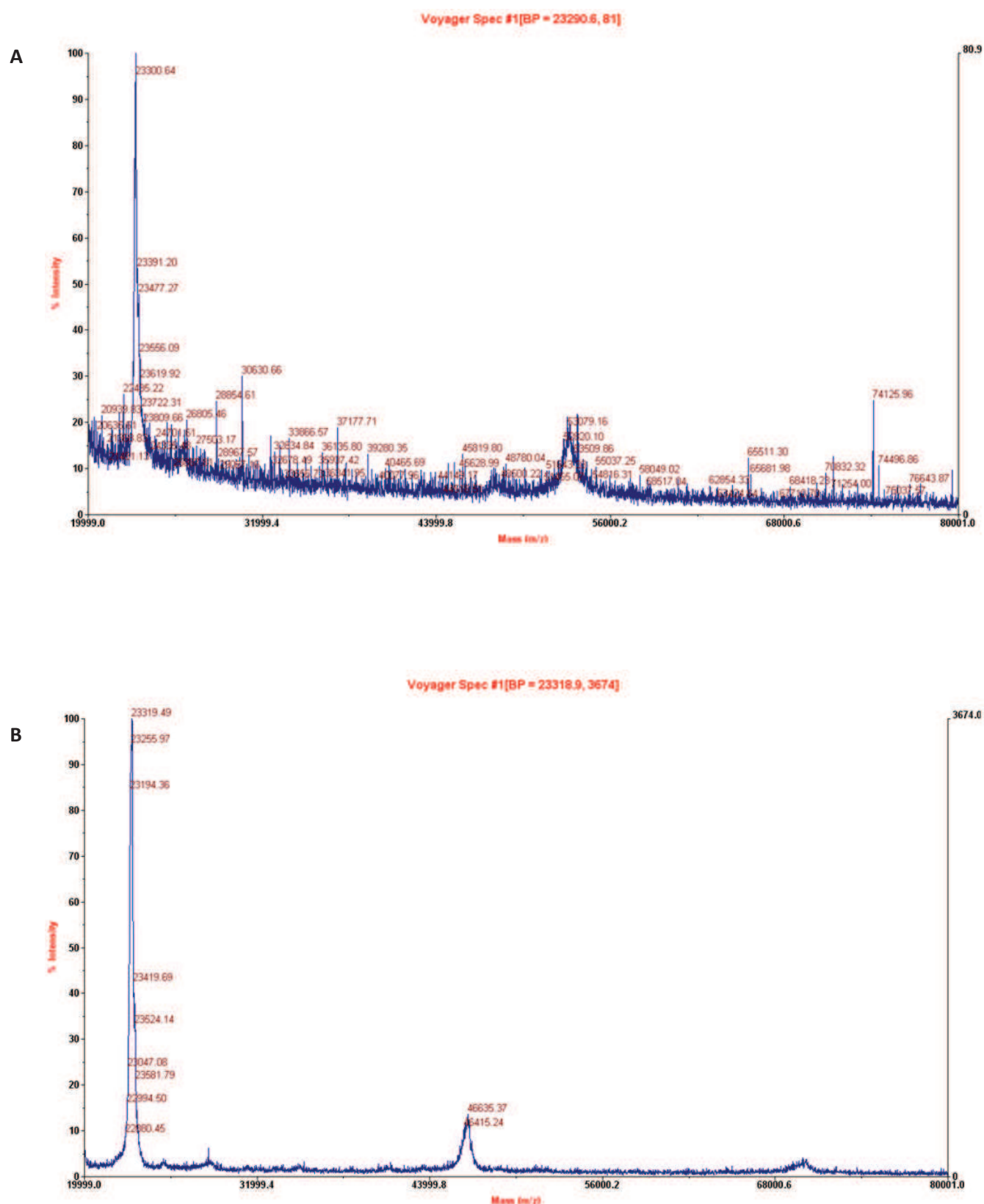


Figure 117 : Spectres MALDI-TOF de (A) la proaérolysine et de (B) l'aérolysine après activation par la trypsine.

### IV.1.3. Lipides

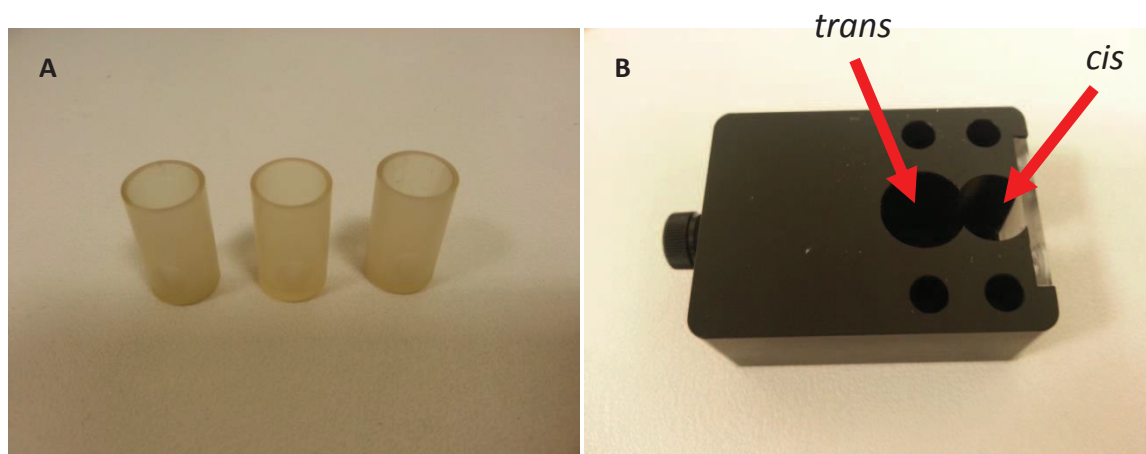
La solution de lipides utilisée pour la formation des membranes est le diphytanoylphosphatidylcholine (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, Aventi Polar Lipids) ([Figure 120](#)). Ces lipides sont des molécules amphiphiles qui possèdent une extrémité polaire hydrophile (groupement phosphocholine) et une extrémité non polaire hydrophobe (chaîne hydrocarbonée). Ce phospholipide est chimiquement pur et fluide à température ambiante, ne nécessitant pas de chauffage à 37 °C à l'inverse d'autres lipides. Il est relativement rigide et permet de construire des membranes résistantes pendant plusieurs heures (l'agitation thermique ne suffit donc pas pour les détruire). Sa courbure spontanée est nulle ce qui favorise la formation des bicouches [7].

0,4 mg de lipides sont dissous dans 50  $\mu$ L d'hexane. Après évaporation de l'hexane, 40  $\mu$ L de décane sont ajoutés au mélange.

## IV.2. Montage expérimental pour les expériences nanopores

### IV.2.1. Equipement

Les différents éléments du montage expérimental utilisés pour les expériences « nanopore » sont représentés dans les schémas et photos de la [Figure 119](#). Les électrodes Ag/AgCl, sont plongées dans la solution saline contenue dans chaque compartiment de la cuve, *cis* et *trans*. Ces deux compartiments sont obtenus par l'introduction d'une cellule en polysulfone (Harvard apparatus, [Figure 118](#), A et B). Elle possède une capacité de 1,5 mL et un méplat sur sa partie basse, au centre duquel est percé un trou de diamètre d'environ 90  $\mu$ m ([Figure 118](#)). Sur ce trou va être déposé un film de lipides constituant une membrane bilipidique. Cette membrane se comporte comme un isolant électrique entre les deux compartiments. Elle est caractérisée par une résistance et une capacité en parallèle. La capacité permet de calculer l'épaisseur de la membrane tandis que la résistance renseigne sur la conductance.

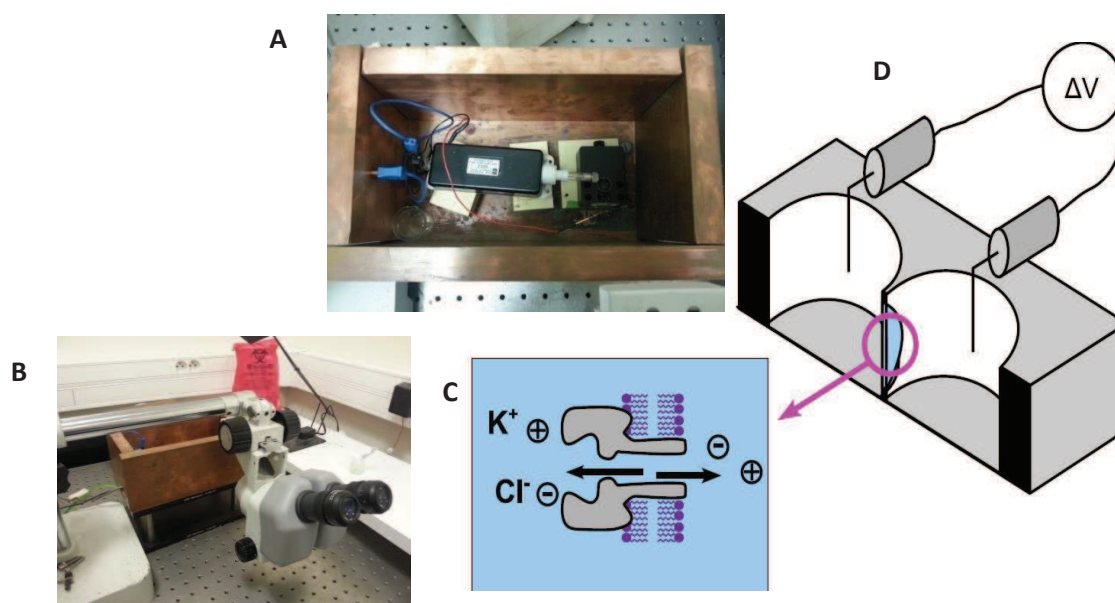


**Figure 118 :** (A) 3 cuves de 1,5 mL et (B) la cellule utilisées pour les expériences de translocation. Les flèches rouges représentent les deux compartiments *cis* et *trans*.



De plus, la cuve et la cellule dans laquelle se trouvent les électrodes sont isolées par une cage de Faraday, en cuivre, permettant de réduire fortement le champ électrique extérieur, pour permettre de mesurer des courants de l'ordre de quelques picoAmpères.

Les deux électrodes Ag/AgCl sont plongées dans les deux compartiments et reliées à un amplificateur de courant (Dagan 3900A). Les données sont filtrées à 10 KHz et l'acquisition se fait à une fréquence d'échantillonnage de 200 KHz (carte d'acquisition National Instrument). Les traces de courant ont été traitées à l'aide du logiciel de traitement de données Igor.



**Figure 119 :** Schéma du montage expérimental. Photos de (A) la cage de Faraday et des électrodes plongées dans la cellule et (B) la binoculaire utilisée et la cage de Faraday. Schéma (C) d'un pore d'α-hémolysine inséré dans une membrane lipidique et (D) des 2 compartiments dans lesquels sont plongées les électrodes.

## IV.2.2. Formation de la membrane lipidique

Afin de former une bicouche, plusieurs étapes sont nécessaires. La première consiste en l'application d'un premier film de lipides, une "pré-couche", au niveau du méplat (où se trouve le trou de 90 μm) de la cellule, à partir d'une solution de lipides dans du décane. Après cette application, la cellule est laissée à l'air libre pendant une trentaine de minutes ou une quinzaine de minutes sous vide, afin de permettre l'évaporation du décane. La cellule est ensuite insérée dans la cuve et la solution tampon y est ajoutée. La méthode utilisée pour former la membrane est celle dite de "peinture" [8]. Un cône de micropipette est plongé dans la solution de lipides dans le décane puis est essuyé de façon à ne garder que quelques traces de lipides. Une bulle de lipide est déposée devant le trou de la cellule, pour former la membrane. Afin de pouvoir mesurer l'épaisseur de cette bicouche, on effectue une mesure de sa capacité électrique. On peut ainsi en déduire par calcul son épaisseur [9] :

$$e = \epsilon_0 \epsilon \frac{S}{C}$$

Avec  $e$  l'épaisseur de la bicouche lipidique,  $\epsilon_0$  la constante électrique,  $\epsilon = 2$  la constante diélectrique de la membrane,  $S$  la surface de la membrane et  $C$  sa capacité.

En général, cette première membrane formée est initialement trop épaisse pour pouvoir permettre l'insertion d'un pore. Il faut donc l'amincir en aspirant et en refoulant l'intégralité du liquide présent dans le compartiment *cis* à l'aide d'une micropipette. Après quelques cycles de cette manipulation, la capacité de la membrane augmente jusqu'à prendre une valeur de  $70 \pm 10$  pF. Cette capacité correspond à des épaisseurs de la membrane de  $4 \pm 1$  nm. La membrane est suffisamment fine pour pouvoir permettre l'insertion d'un nanopore protéique.

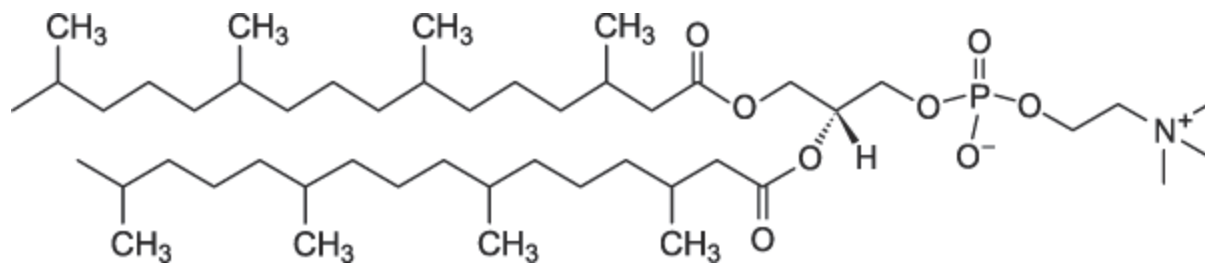


Figure 120 : Structure moléculaire du diphytanoyl-phosphatidylcholine.

### IV.2.3. Insertion du pore dans la membrane

Une fois la membrane suffisamment fine, un nanopore peut y être inséré. Dans le cas de l'aérolysine, une solution de 10  $\mu\text{L}$  est préparée en mélangeant de la proaérolysine, de l'eau milli-Q et de la trypsine, de façon à ce que la concentration finale en trypsine soit égale à 0,4  $\mu\text{M}$  et que celle en aérolysine soit égale à 0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Pour l' $\alpha$ -hémolysine, la solution commerciale (Sigma-Aldrich, H9395) est stockée à la concentration de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  puis est diluée pour obtenir une concentration finale de 0,015  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Ces dilutions permettent d'introduire dans le compartiment *cis* les solutions d'aérolysine ou d' $\alpha$ -hémolysine aux concentrations finales respectives de 1,2  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  et 0,0075  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Ces concentrations sont suffisamment élevées pour permettre l'insertion d'un pore en moins d'une heure et suffisamment faibles pour que cette insertion soit unique.

Lors des expériences de translocation des molécules, la tension appliquée est de 70 mV pour l'aérolysine ou de 100 mV pour l' $\alpha$ -hémolysine entraînant respectivement des courants de  $32 \pm 4$  pA et  $99 \pm 6,5$  pA. Cependant, des tensions variables de 0 à 100 mV environ pour l'aérolysine ou jusqu'à 200 mV pour l' $\alpha$ -hémolysine, ont été testées de façon à déterminer l'influence de la tension sur la durée, la fréquence de translocation, et le taux de blocage des macromolécules traversant le pore.

### **IV.3. Conditions expérimentales pour la mesure du transport à travers un nanopore**

#### **IV.3.1. Transport d'oligosaccharides individuels**

Les conditions tampon d'une expérience nanopore classique consiste en 1 mL de solution tampon HEPES 5 mM, pH 7,5 KCl 1M, introduit dans chacun des deux compartiments de la cellule. D'autres expériences dans le même tampon mais à différentes forces ioniques ont été réalisées avec des concentrations en KCl de 2 M, 3 M, 4 M et 4,5 M. Cependant, dans le cas de la réaction enzymatique, les conditions de tampon ont du être modifiées afin d'être compatibles avec l'utilisation de l'enzyme (Cf. Partie III.3.1.a).

#### **IV.3.2. Réaction enzymatique réalisée hors du compartiment nanopore**

Lors de cette réaction enzymatique, menée au bain marie, les conditions expérimentales sont choisies pour obtenir le fonctionnement optimal de l'enzyme. Le milieu réactionnel utilisé est une solution tampon acétate de sodium NaAc 0,1 M, pH 5,2, chlorure de sodium NaCl 0,15 M. L'acide hyaluronique est ajouté à la concentration de 3 mg/mL puis la solution est placée sous agitation pendant une nuit, pour obtenir la dissolution complète de l'acide hyaluronique. Le mélange réactionnel est ensuite chauffé à 37°C dans un bain marie pendant 30 minutes avant ajout de 0,15 mg/mL de hyaluronidase (EC 3.2.1.35, Sigma). Des prélèvements de 800 µL sont effectués à différents intervalles de temps et immédiatement chauffés à 100°C pendant 2 minutes afin d'inactiver l'enzyme [10]. Les échantillons sont ensuite congelés à -80°C.

Pour étudier les produits de cette digestion enzymatique, 800 µL du mélange réactionnel (dont l'enzyme a été préalablement inactivée par chauffage à 100°C) ont été décongelés, auxquels 200 µL de KCl 4,5 M, 5 mM HEPES, pH 7,5 ont été ajoutés.

#### **IV.3.3. Réaction enzymatique réalisée directement dans le compartiment nanopore**

Dans le cas de la réaction enzymatique menée directement dans le compartiment *cis* des nanopores, les conditions réactionnelles présentent les différences suivantes : la réaction enzymatique n'est plus chauffée à 37°C, notre montage expérimental n'offrant pas la possibilité de chauffage. La réaction est alors faite à température ambiante (environ 21°C). De plus, à 3 mg/mL en acide hyaluronique, la solution se trouve très proche de la gélification. L'insertion des pores d'aérolysine ayant lieu uniquement par diffusion, aucun pore ne fut observé à ces concentrations. Pour pallier ce problème, la concentration en acide hyaluronique a donc été divisée par 4, à 0,75 mg/mL. La vitesse de digestion enzymatique s'en trouve alors réduite. C'est pourquoi le rapport quantité d'enzyme / quantité de substrat, a été doublé pour augmenter la vitesse de réaction. Le rapport enzyme / substrat est ici doublé par rapport à la réaction menée en deux étapes, à 37 °C.

#### IV.4. Traitement du signal obtenu lors des expériences nanopore

Les données sont traitées et analysées à l'aide du logiciel Igor. La première étape consiste en l'application d'un filtre permettant de réduire le bruit électrique. Pour cela on utilise un filtre médian de taille 5 (Figure 121), en prenant la valeur médiane sur cinq points consécutifs, sans modifier le signal d'intérêt.

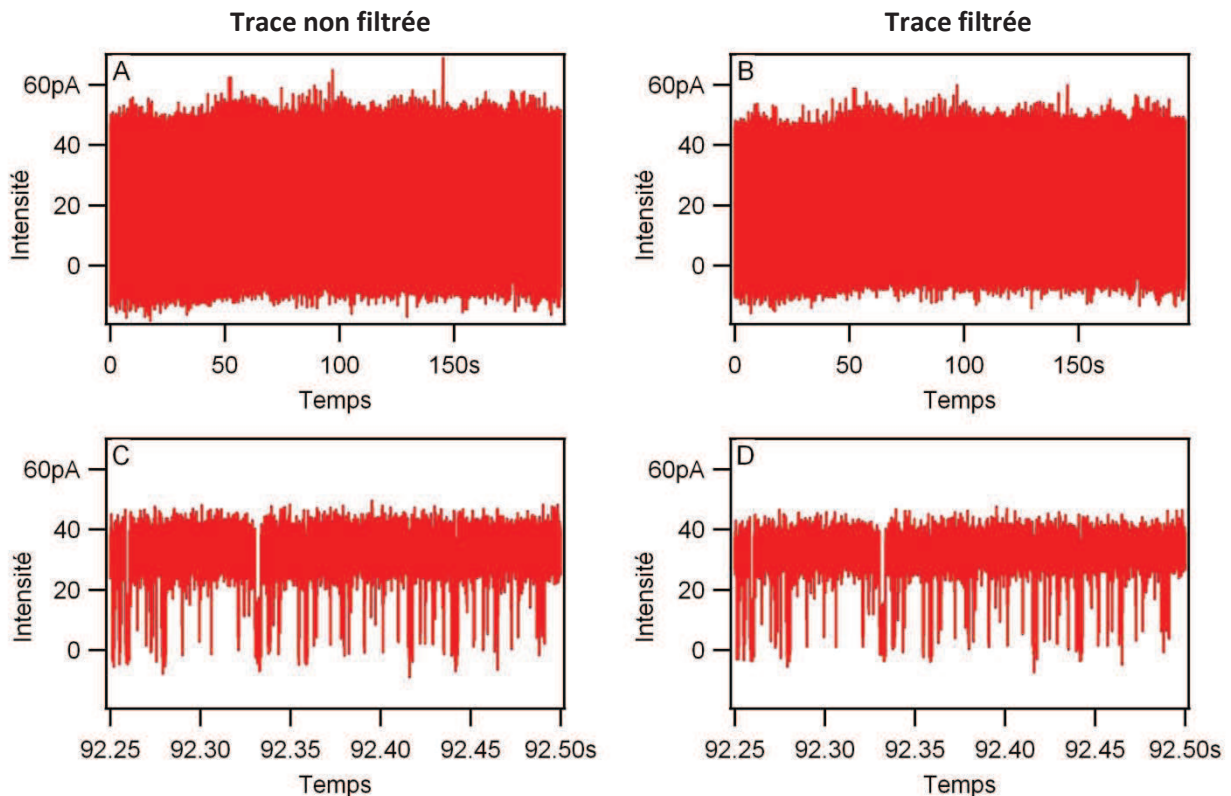


Figure 121 : Exemple de traces (A et C) avant ou (B et D) après application du filtre médian de taille 5.

Après avoir filtré la trace, il faut calculer les seuils qui vont être utilisés pour la détection des événements. Deux seuils sont utilisés. Le premier sert à détecter les événements. Par exemple si ce premier seuil est à 22,969 pA, le logiciel va détecter combien de pics se trouvent sous cette valeur. Le deuxième seuil est utilisé pour compter le nombre de pics ne se trouvant pas dans le bruit et que l'on considère comme des « événements de translocation » des molécules (les événements de trop faible amplitude tels que les attaques des oligosaccharides sur le pore ne sont ainsi en majorité pas pris en compte). Par exemple si le deuxième seuil est à 16,734 pA, le logiciel va calculer combien de pics se trouvent sous cette valeur. Ces seuils peuvent être choisis de différentes façons, l'essentiel étant de toujours conserver le même critère de sélection des pics afin que les résultats puissent être correctement comparés. Notre groupe (au laboratoire LAMBE, à l'université d'Evry Val d'Essonne) [11] place généralement les seuils de façon algébrique, en calculant la déviation standard  $\sigma$ , représentant la quantité de bruit électrique présent sur les mesures. Ceci est possible car le bruit électrique possède une distribution gaussienne. En utilisant ce paramètre, il est en théorie possible d'éviter de prendre en compte tous les événements dus au bruit électrique. Les deux seuils sont placés à  $-2\sigma$  et  $-3\sigma$ .

Cependant, d'après les expériences réalisées au cours de cette thèse, cette façon de placer les seuils prend en compte trop d'événements dus au bruit électrique. C'est pourquoi la méthode utilisée ici est "graphique" (Figure 122, A et B). Sur la Figure 122, B est représenté l'histogramme des intensités de blocage. Cette courbe se présente sous la forme de deux gaussiennes successives. Le seuil le plus bas (ici appelé "Seuil 2") correspond à l'intersection entre ces deux gaussiennes, tandis que l'autre seuil (le "Seuil 1") correspond à la projection du sommet de la gaussienne de gauche sur la gaussienne de droite.

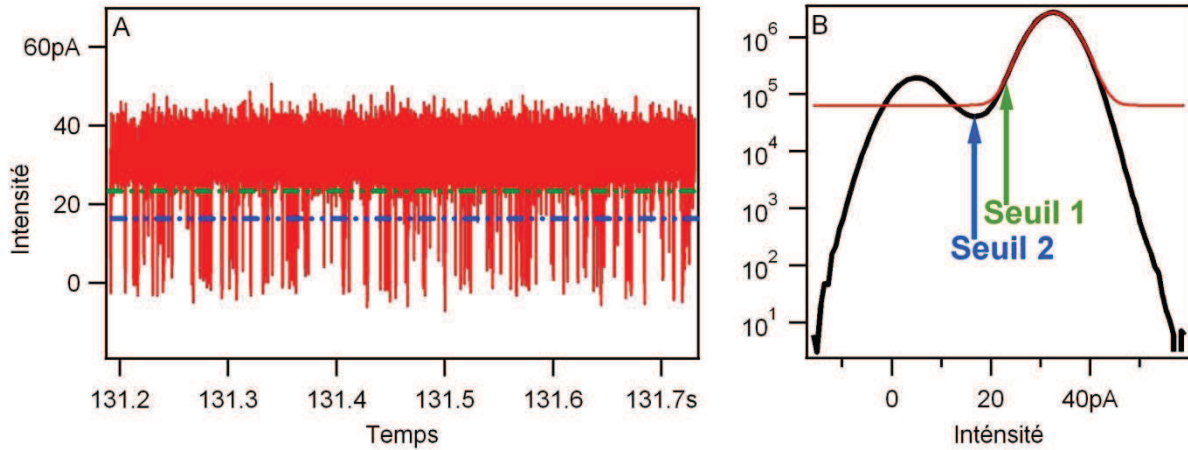


Figure 122 : (A) Trace sur laquelle ont été placés les seuils de détection trouvés à l'aide de l'histogramme des intensités (B).

Après avoir déterminé les seuils, on détecte chaque blocage, caractérisé par sa durée, son amplitude et la durée entre deux blocages successifs.

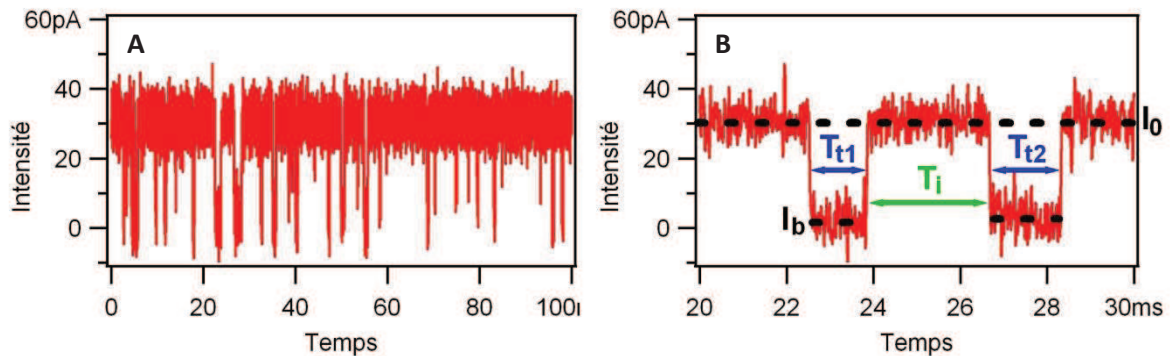


Figure 123 : (A) Trace caractéristique montrant des événements. (B) Zoom autour de temps plus faibles. I<sub>0</sub> représente le courant de pore ouvert, I<sub>b</sub> le courant de blocage, T<sub>i</sub> le temps inter-événements, et les T<sub>ti</sub> les durées de blocage.

L'un des graphes obtenus trace la distribution des durées inter-événements (T<sub>i</sub>) (Figure 124, A). Cette distribution est exponentielle ( $\propto e^{-f \times T_i}$ ), les événements étant indépendants les uns des autres [12]. Cela nous permet de trouver pour cet exemple une fréquence d'événements de 303 Hz. L'histogramme des durées d'événements est également tracé, nous donnant la distribution des durées de translocation des molécules à travers le pore. En traçant cet histogramme avec une échelle logarithmique et en ajustant la distribution par une fonction LogNormal, on retrouve la durée la plus probable de passage [13]. Ici, on trouve 182  $\mu$ s. D'autres graphes sont également tracés tels que les nuages de points mais ils ne sont que très rarement utilisés.



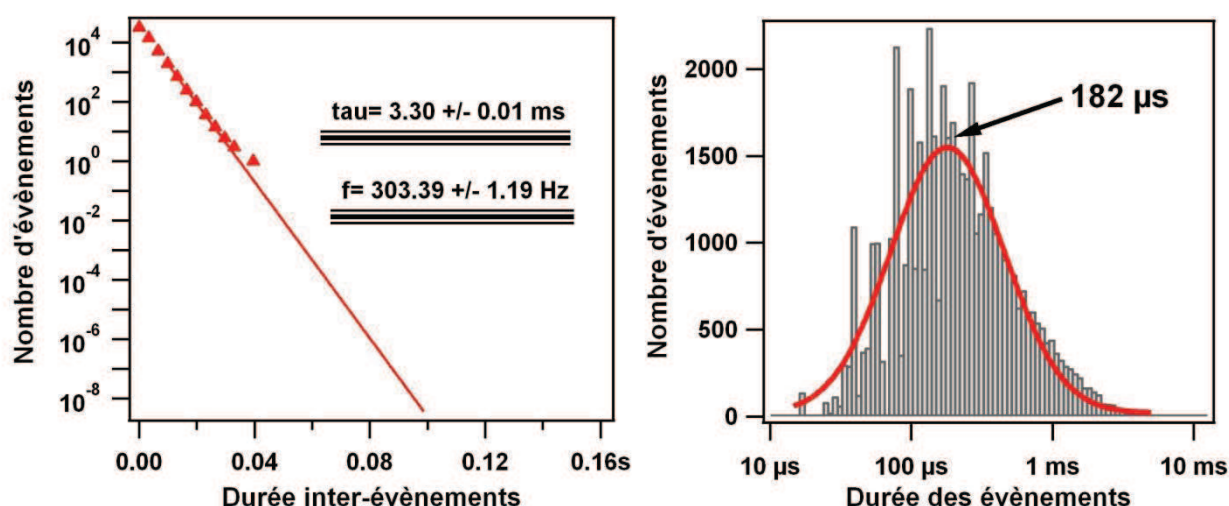


Figure 124 : (A) Calcul de la fréquence et (B) Histogramme des durées des événements.

## IV.5. Analyse MS des oligosaccharides ayant traversé le nanopore

La méthode d'analyse par nanopore n'étant pas destructrice, le contenu des deux compartiments peut être récupéré pour être réutilisé ultérieurement. De même, il est également possible d'analyser le contenu du compartiment *trans* après les expériences de translocation, pour vérifier si les molécules ont bien traversé le nanopore ou non. Pour cela, les solutions des deux compartiments *cis* et *trans* ont à la fin de chacune des expériences été récupérés séparément et conservées à  $+4^\circ\text{C}$ , afin. Cependant, avant les analyses, une étape de purification est primordiale pour retirer les sels présents en solution, les analyses nanopore étant effectuées à des concentrations au minimum de 1 M en KCl.

### IV.5.1. Dessalage des échantillons

Dans le cas des oligosaccharides, les purifications par Ziptip ne sont pas très efficaces. D'autres méthodes de dessalage ont donc été nécessaires. Pour les échantillons récupérés après analyse nanopore, les solutions correspondant aux hexa-, octa- et décacaccharide de l'acide hyaluronique ont chacune été récupérées séparément puis dialysées à travers un boudin de dialyse avec un seuil de coupure à 500 Da (SERVA Electrophoresis, membranes de dialyse Spectra/Por® Biotech CE). L'eau distillée est remplacée après 1h, 2h, 6h puis 24h. Les solutions contenues dans les boudins de dialyse sont lyophilisées.

Une autre méthode possible nécessite de petites colonnes de chromatographie appelée PD-10 (GE Healthcare). Ces petites colonnes de gel filtration (Sephadex G10) utilisent la gravité pour séparer les molécules de masse moléculaire supérieure à 700 g/mol des molécules plus petites comme les sels ou



autres contaminants. Les molécules sont séparées en fonction de leur taille. Ainsi, les oligosaccharides en solution vont quitter la colonne en premier, chaque goutte tombant l'une après l'autre par gravité, puis les sels sortiront. En ne gardant que les premières gouttes correspondant aux oligosaccharides un dessalage efficace des sels est ainsi fait. L'inconvénient de cette méthode est sa lenteur et la nécessité d'être toujours présent pour contrôler le dessalage.



**Figure 125** : Colonne de dessalage PD MidiTrap G-10, GE Healthcare, utilisée ici pour séparer les oligosaccharides de plus de 700 g/mol des sels présents en solution.

Cependant, une troisième méthode, utilisant des kits de dialyse ayant un seuil de coupure à 1 kDa (GE Healthcare) a été retenue pour les purifications des oligosaccharides. Pour cela, 1,5 mL de solution ont été mis dans chaque tube, puis ils ont tous été mis dans un récipient rempli d'eau distillée. Ici encore, l'eau distillée est remplacée après 1h, 2h, 6h puis 24h. Les solutions maintenant dépourvues de sels, contenues dans les tubes, sont récupérées puis lyophilisées. L'avantage de cette méthode, malgré sa plus longue durée de fonctionnement, est qu'elle ne nécessite pas une présence constante de l'utilisateur.



**Figure 126** : Kits de dialyse utilisés pour dessaler les échantillons prélevés dans le compartiment *trans* de la cellule nanopore.

### IV.5.2. Analyse ESI-MS des compartiments *trans*, après translocation des molécules

Les compartiments *trans* de sept expériences de translocation d'un hexasaccharide de l'acide hyaluronique ont été rassemblés et filtrés sur une colonne Sephadex G-25 préalablement équilibrée dans de l'eau (PD MiniTrap G-10, GE Healthcare, Uppsala, Suède). Les échantillons dessalés ont été lyophilisés et resuspendus dans 15  $\mu\text{L}$  d'une solution eau/méthanol (1/1) avant les analyses ESI-MS. Une expérience de contrôle a été menée en l'absence d'oligosaccharide dans le compartiment *cis*.

Les expériences ESI-MS ont été effectuées avec un LTQ-Orbitrap XL de Thermo Scientific (San José, CA, USA) en mode d'ionisation négative, avec une tension de spray de -3 kV, et un flux de gaz de 11 unités arbitraires. Un mélange eau/méthanol au ratio 1/1 est continuellement infusé à l'aide d'une seringue de 250  $\mu\text{L}$ , à un flux de 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  à travers une boucle de 10  $\mu\text{L}$ . Un échantillon de 5  $\mu\text{L}$  dans un mélange eau/méthanol a été injecté, permettant l'obtention d'un signal durant au moins 1 minute. Les tensions appliquées sont de -19 et -120 V pour le capillaire de transfert d'ions et la lentille de focalisation des ions respectivement. Le capillaire de transfert d'ions est maintenu à la température de 275 °C. La résolution est fixée à 30 000 (pour  $m/z$  400) pour toutes les études, et la gamme de  $m/z$  est fixée entre 300 et 1200. Les spectres sont analysés avec le logiciel d'acquisition XCalibur 2.0.7 (Thermo Scientific, San José, CA, USA), sans lissage des données. Pendant les scans MS/MS, les fragmentations par dissociation induite par collision (CID) ont lieu dans l'analyseur à trappe ionique. La détection est réalisée dans l'Orbitrap en mode centroid. Pour les fragmentations CID, une valeur d'activation Q (Q) de 0,25 et un temps d'activation (T) égal à 30 ms ont été utilisés. L'énergie de collision normalisée (NCE) est fixée à 20% pour la MS/MS, 15% pour la  $\text{MS}^3$ , 20% pour la  $\text{MS}^4$ , pour toutes les espèces dichargées, et 15% pour toutes les  $\text{MS}^n$  (avec  $n=2$  à 4) pour les espèces trichargées.

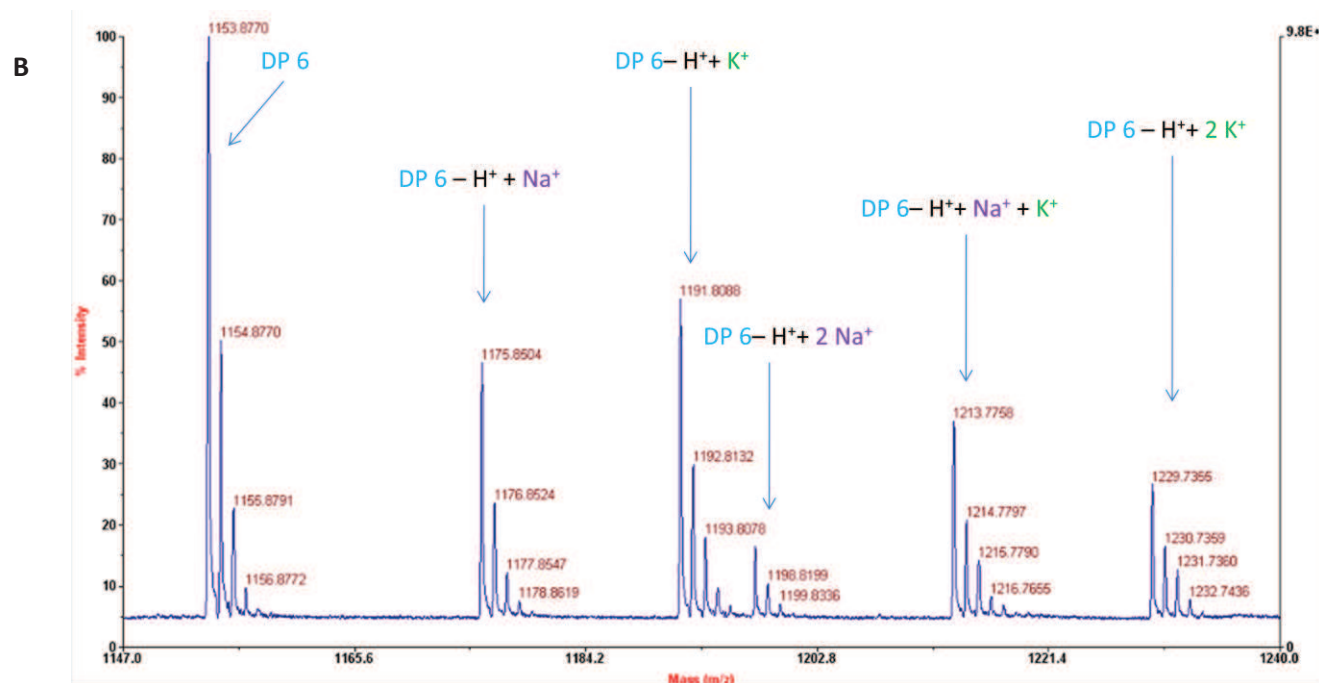
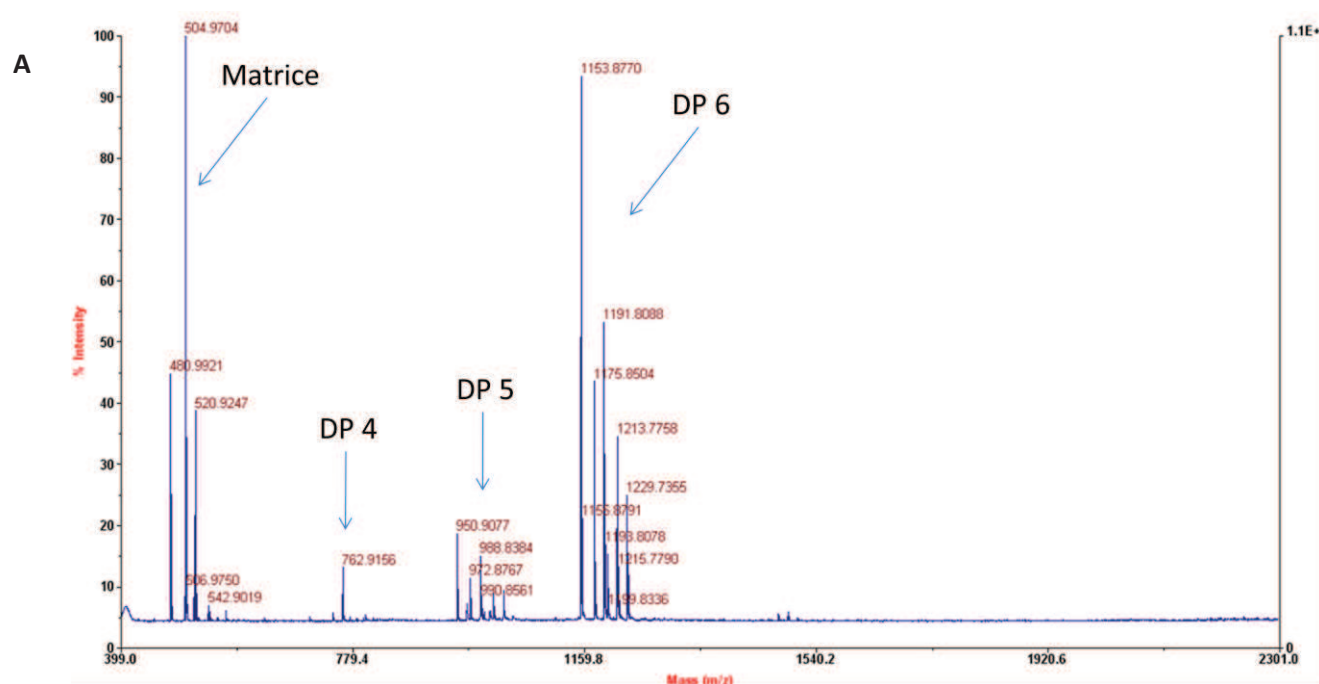
Le contrôle automatique du gain (AGC) a permis l'accumulation de  $1.10^6$  ions pour les scans FTMS (spectrométrie de masse à transformée de fourrier),  $2.10^5$  ions pour les scans  $\text{FTMS}^n$  et  $1.10^4$  ions pour les scans  $\text{ITMS}^n$  (spectrométrie de masse à trappe ionique). Le temps maximal d'injection est réglé à 500 ms pour les scans FTMS et  $\text{FTMS}^n$  et à 100 ms pour les scans  $\text{ITMS}^n$ . Pour tous les scans, l'acquisition d'1  $\mu\text{scan}$  a été effectuée. La fenêtre de sélection du précurseur est de 2 Da pendant les expériences  $\text{MS}^2$ .

### IV.5.3. Analyse MALDI-TOF des échantillons récupérés après analyse

Les échantillons sont lyophilisés pour faire disparaître toute trace d'eau et ne garder que les molécules sous forme de poudre. Les oligosaccharides sont ensuite analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 127 A à D) en mode réflectron, en ionisation négative. La tension d'accélération est fixée à 20 kV, le délai d'extraction à 300 nanosecondes. Les échantillons sont mélangés à un ratio 50/50 avec la matrice (l'acide 2-(4-hydroxyphenylazo)benzoïque combinée avec la 1,1,3,3-tetraméthylguanidine, HABA/TMG<sub>2</sub>). La matrice est utilisée à la concentration de  $10^{-1}$  M et les échantillons à 10 pmol/ $\mu\text{L}$ .

Sur les spectres A et C, les oligosaccharides ont été dégradés, surtout dans le cas du décasaccharide (Figure 127, C). Cependant, ceci est normal car les solutions sont parfois restées jusqu'à 2 années avant

d'être lyophilisées. De plus, on observe de nombreux adduits sodium et potassium dus à la présence de ces contre ions dans les solutions tampon utilisées lors des expériences.



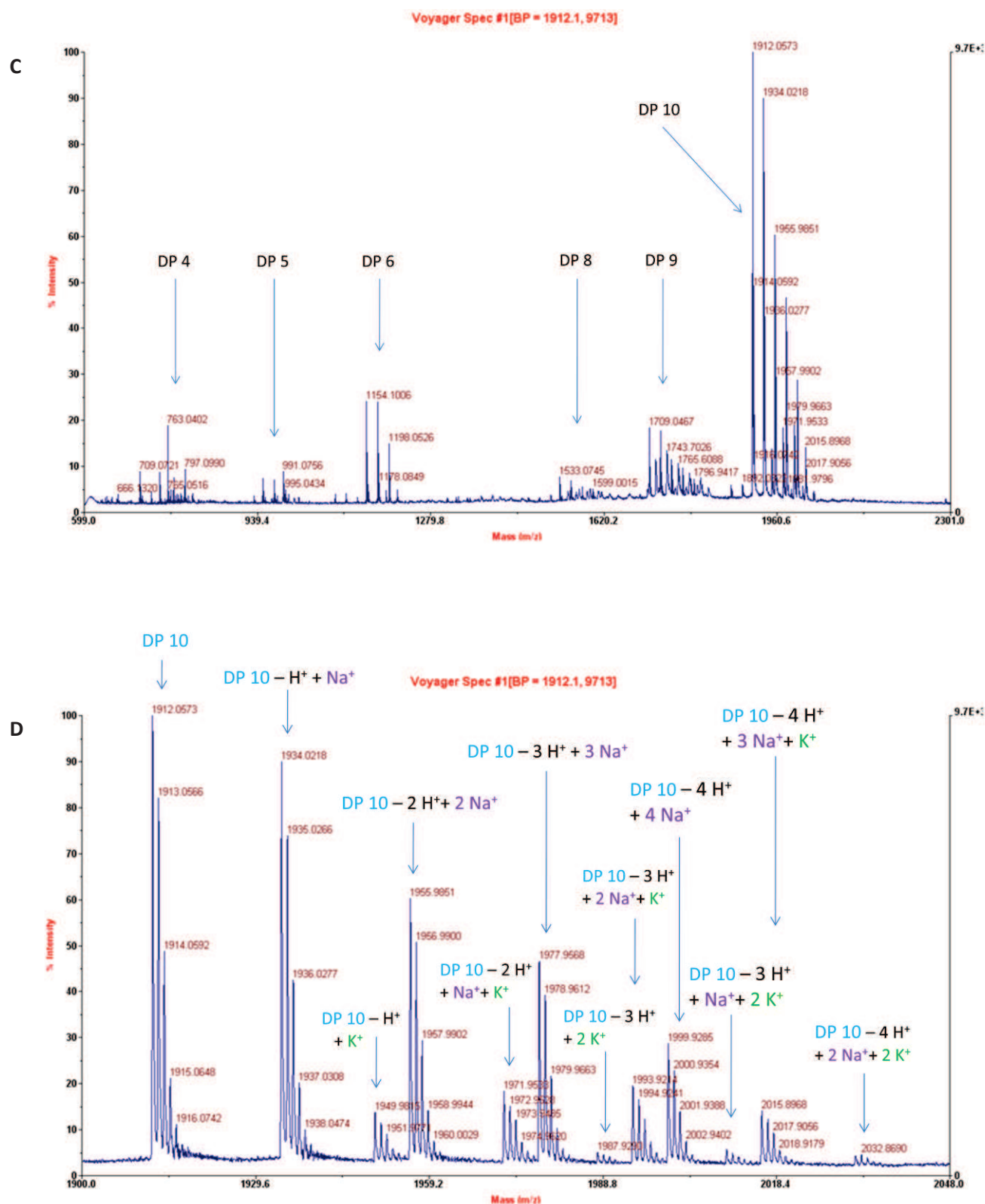


Figure 127 : Spectres MALDI-TOF correspondant à (A et B) l'hexasaccharide et au (C et D) décasaccharide de l'acide hyaluronique, récupérés après les analyses nanopore et après dialyse et lyophilisation.

## IV.6. Réaction enzymatique suivie par spectroscopie UV-Visible

La réaction de dépolymérisation enzymatique de l'acide hyaluronique par la hyaluronidase a été suivie par spectroscopie UV-Visible de façon à pouvoir effectuer une comparaison avec les résultats obtenues pour le suivi par nanopore.

Pour cela, les dépolymérisations ont été effectuées dans différentes conditions, chauffées dans un bain-marie ou un bain sec à 21 ou 37 °C. Les conditions expérimentales reproduites ici sont les mêmes que celles qui avaient été fixées lors de l'analyse par nanopore dans le chapitre 2. Pour la réaction à 37 °C, 3 mg d'acide hyaluronique ont été dissouts dans 1 mL de solution NaAc 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 5,2 auxquels 224 unités de hyaluronidase ont ensuite été ajoutées. Lors de la réaction enzymatique à 21 °C, 0,75 mg d'acide hyaluronique a été dissout dans 1 mL de solution constituée d'un mélange de 800 µL d'une solution NaAc 0,1 M, NaCl 0,15 M et de 200 µL de solution HEPES 5 mM, KCl 4,5 M, à pH 7,5. 112 unités de hyaluronidase ont ensuite été ajoutées. Différents prélèvements ont été effectués au cours du temps afin de suivre l'évolution du milieu réactionnel, et dilués au 1/200<sup>e</sup> ou au 1/100<sup>e</sup> pour les produits de la réaction à 37 °C ou à 21 °C respectivement. Ces dilutions permettent de mesurer des densités optiques comprises entre 0 et 1.

Les échantillons prélevés ont été mélangés à une solution de 1,1 mg/mL d'un sel de tetrazonium, le 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate] (WST-1) dans NaOH 0,1 M, au ratio 1/1, puis chauffés pendant 1h à 60 °C. Ce produit réagit avec les extrémités réductrices des polysaccharides et provoque une coloration bleue de la solution, plus ou moins importante en fonction de la concentration en polysaccharides en solution. L'absorbance des différents échantillons est ensuite mesurée par un spectrophotomètre UV, à la longueur d'onde de 584 nm.

## IV.7. Références bibliographiques

1. Price, K.N., Al, T., Baker, D.C., Chisena, C., and Cysyk, R.L., *Isolation and characterization by electrospray-ionization mass spectrometry and high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides derived from hyaluronic acid by hyaluronate lyase digestion: observation of some heretofore unobserved oligosaccharides that contain an odd number of units*. Carbohydr Res, 1997. **303**(3): p. 303-11.
2. Moniatte, M., van der Goot, F.G., Buckley, J.T., Pattus, F., and van Dorsselaer, A., *Characterisation of the heptameric pore-forming complex of the Aeromonas toxin aerolysin using MALDI-TOF mass spectrometry*. FEBS Letters, 1996. **384**(3): p. 269-272.
3. Howard, S.P. and Buckley, J.T., *Molecular cloning and expression in Escherichia coli of the structural gene for the hemolytic toxin aerolysin from Aeromonas hydrophila*. Mol Gen Genet, 1986. **204**(2): p. 289-95.
4. Parker, M.W., Van Der Goot, F.G., and Buckley, J.T., *Aerolysin — the ins and outs of a model channel-forming toxin*. Molecular Microbiology, 1996. **19**(2): p. 205-212.
5. van der Goot, F.G., Pattus, F., Parker, M., and Buckley, J.T., *The cytolytic toxin aerolysin: from the soluble form to the transmembrane channel*. Toxicology, 1994. **87**(1-3): p. 19-28.
6. Abrami, L., Fivaz, M., Decroly, E., Seidah, N.G., Jean, F., Thomas, G., Leppla, S.H., Buckley, J.T., and van der Goot, F.G., *The Pore-forming Toxin Proaerolysin Is Activated by Furin*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(49): p. 32656-32661.
7. Lindsey, H., Petersen, N.O., and Chan, S.I., *Physicochemical characterization of 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine in model membrane systems*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1979. **555**(1): p. 147-167.
8. Mueller, P., Rudin, D.O., Tien, H.T., and Wescott, W.C., *Methods For The Formation of Single Bimolecular Lipid Membranes in Aqueous Solution*. The Journal of Physical Chemistry, 1963. **67**(2): p. 534-535.
9. Bacri, L., Benkhalel, A., Guégan, P., and Auvray, L., *Ionic Channel Behavior of Modified Cyclodextrins Inserted in Lipid Membranes*. Langmuir, 2005. **21**(13): p. 5842-5846.
10. Powell, A.K., Ahmed, Y.A., Yates, E.A., and Turnbull, J.E., *Generating heparan sulfate saccharide libraries for glycomics applications*. Nat Protoc, 2010. **5**(5): p. 821-33.
11. Oukhaled, G., Bacri, L., Mathé, J., Pelta, J., and Auvray, L., *Effect of screening on the transport of polyelectrolytes through nanopores*. EPL (Europhysics Letters), 2008. **82**(4): p. 48003.
12. Meller, A. and Branton, D., *Single molecule measurements of DNA transport through a nanopore*. Electrophoresis, 2002. **23**(16): p. 2583-91.
13. Meller, A., Nivon, L., Brandin, E., Golovchenko, J., and Branton, D., *Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(3): p. 1079-84.



---

## Conclusions et Perspectives

---



L'objectif de cette thèse était d'adapter la technique des nanopores, une technique d'analyse récente, principalement utilisée pour les analyses de molécules d'ADN ou de protéines, à l'analyse de polysaccharides. Ces molécules sont parmi les plus hétérogènes, présentant une grande variété interindividuelle. Source de nombreuses activités biologiques, ces molécules manquent grandement de moyens efficaces d'analyse. Les travaux présentés dans cette thèse sont parmi les premiers à utiliser la technique des nanopores, qui est en quelque sorte une technique d'électrophorèse capillaire « ultime », appliquée à l'analyse des polysaccharides.

Nous avons d'abord montré la faisabilité de la méthode d'analyse par nanopore en détectant et discriminant correctement trois oligosaccharides (de degré de polymérisation 6, 8 et 10) de l'acide hyaluronique, pourtant séparés d'une seule unité disaccharidique. Cette discrimination est principalement réalisée sur la base de leur durée de translocation à travers un nanopore d'aérollysine. Nous avons mis en évidence les difficultés de détection des plus petits oligosaccharides.

Des oligosaccharides de l'héparine ont ensuite été étudiés mais leur détection lors de la translocation de ces macromolécules à travers l'aérollysine n'a pas été possible dans les conditions standards d'analyse. L'encombrement stérique ajouté à ces oligosaccharides par les imposants groupements sulfate semblerait les empêcher d'entrer dans le pore. L'utilisation d'un nanopore d' $\alpha$ -hémolysine, dont le canal interne est supposé être légèrement plus important que celui de l'aérollysine, n'a malheureusement pas non plus permis leur détection.

L'augmentation de la force ionique, passant de 1 M à 4 M KCl, semble permettre cette détection. La détection d'oligosaccharides du dermatane sulfate et du dextrane sulfate a quant à elle été réalisée sans encombre dans le nanopore d' $\alpha$ -hémolysine, nous permettant d'affirmer que la présence de groupements sulfates sur une chaîne n'empêche pas sa translocation à travers ce nanopore.

La preuve de la translocation des molécules d'un compartiment à l'autre est une question qui restait en suspens depuis la mise au point de cette technique. Nous avons, pour la première fois, prouvé la réalité du transport des molécules, du compartiment d'entrée *cis* vers le compartiment de sortie *trans*, par spectrométrie de masse, en analysant la composition du compartiment *trans* après plusieurs expériences de translocation d'un hexasaccharide de l'acide hyaluronique à travers l'aérollysine.

Après avoir correctement discriminé différents oligosaccharides de l'acide hyaluronique à travers un nanopore d'aérollysine, nous avons effectué le suivi de la dépolymérisation enzymatique de l'acide hyaluronique par la hyaluronidase dans le second chapitre des résultats (Chapitre III). Deux stratégies ont été utilisées pour effectuer ce suivi :

- Effectuer la réaction enzymatique dans les conditions optimales de l'enzyme puis effectuer l'analyse nanopore de différents prélèvements au cours du temps, après avoir inactivé l'enzyme.
- Introduire le mélange réactionnel directement dans le compartiment *cis*, afin de suivre la réaction enzymatique en temps réel au cours de la dépolymérisation.

La hyaluronidase effectuant un clivage des liaisons  $\beta(1\rightarrow4)$  de l'acide hyaluronique, une augmentation du nombre de molécules présentes en solution ainsi qu'une diminution de leur longueur moyenne devraient être observées. La détection nanopore à différents moments de la réaction enzymatique, quelle que soit la stratégie utilisée, montre une évolution du milieu de réactionnel, avec une hausse des fréquences d'événements et une diminution du temps moyen de translocation des molécules, confirmant nos attentes.

Cette réaction de dépolymérisation a également été menée à travers le nanopore d' $\alpha$ -hémolysine. Ces expériences nous ont permis de mettre en évidence les différences de comportement des oligosaccharides de l'acide hyaluronique à travers ces deux nanopores. En effet leur translocation à travers le nanopore d' $\alpha$ -hémolysine n'est pas détectée. Ceci s'explique par leur vitesse de translocation beaucoup plus élevée qu'à travers le nanopore d'aérolysine. Lors de la réaction enzymatique, seuls les polysaccharides très longs, présents au début de la réaction sont détectés, tandis que les plus petits oligosaccharides formés au cours du temps ne le sont plus.

Une étude cinétique de la dépolymérisation de l'acide hyaluronique a été effectuée en faisant varier la concentration en substrat pour une même concentration d'enzyme. Les fréquences d'événements ont été mesurées et nous ont permis de déterminer les paramètres cinétiques de la réaction,  $K_M$  et  $v_{max}$ . Les valeurs de ces paramètres, détectées à l'échelle de la molécule unique, sont proches de celles de la littérature, mesurées en solution par spectrophotométrie.

Cette réaction enzymatique a également été suivie par spectroscopie UV-Visible. Le même comportement a été observé, confirmant ainsi les analyses nanopores que nous avons effectuées.

L'analyse de polysaccharides par nanopore est une technique d'analyse très prometteuse, mais elle nécessite encore d'être perfectionnée. La détection de la translocation de ces molécules est dépendante du nanopore utilisé (comme nous l'avons vu avec l'utilisation de l'aérolysine et l' $\alpha$ -hémolysine). Il serait alors intéressant d'en tester d'autres pour essayer d'en trouver un permettant une meilleure discrimination des oligosaccharides. L'insertion d'un adaptateur comme la  $\beta$ -cyclodextrine dans le nanopore d' $\alpha$ -hémolysine pourrait également constituer une étude intéressante.

La réaction enzymatique de l'acide hyaluronique, telle que nous la suivons, ne nous permet que d'estimer une longueur moyenne des oligosaccharides présents en solution. La détection du suivi de cette dépolymérisation dans une solution tampon de force ionique plus élevée (entre 3 et 4 M KCl) pourrait éventuellement permettre de ralentir fortement le transport des chaînes et de discriminer les différents oligosaccharides par leur taux de blocage dans le pore, et ainsi d'effectuer, en parallèle avec le suivi enzymatique, de la « nano-spectrométrie » de masse par nanopore, comme cela a déjà été montré pour des molécules de PEG polydisperses.

Le principal défaut des nanopores protéiques est la fragilité des membranes lipidiques dans lesquelles ils sont insérés. Pour pallier ce défaut, l'utilisation d'un système de formation rapide de multiples membranes en parallèle, comme celui développé par la société Nanion en collaboration avec l'Université de Freiburg en Allemagne, permettrait d'obtenir de plus nombreux résultats en un temps plus rapide. Ceci permettrait ainsi une meilleure analyse et une meilleure discrimination des analytes présents en solution.

Une autre piste à suivre serait d'utiliser la robustesse mécanique des membranes de nitrure de silicium comportant des nanopores solides à la place des membranes lipidiques. Ces systèmes auront une plus grande stabilité mécanique et temporelle adaptée au suivi des réactions enzymatiques sur plusieurs

jours, une meilleure résistance dans des conditions expérimentales extrêmes comme des forces ioniques ou des températures élevées.

L'observation des différents domaines sulfatés de l'héparine n'a cependant pas été possible mais de plus amples expériences devraient être effectuées. Comme cela a été fait pour l'acide hyaluronique, l'analyse de la dépolymérisation enzymatique de l'héparine à travers un nanopore d' $\alpha$ -hémolysine pourrait peut-être mener aux mêmes conclusions : l'absence de détection pourrait être due à la translocation trop rapide des oligosaccharides fortement chargés de l'héparine.



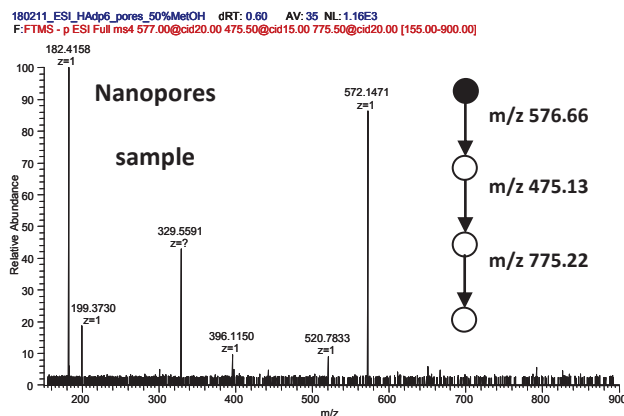
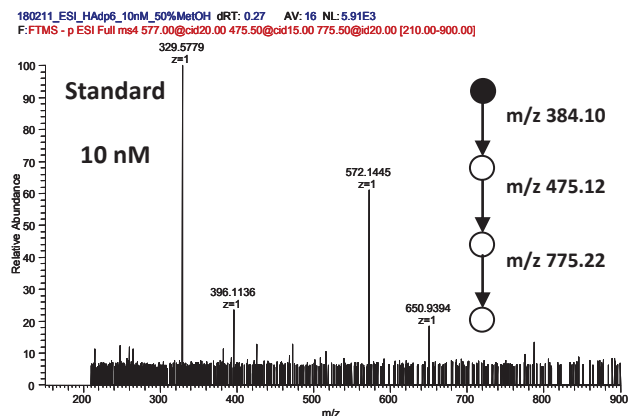
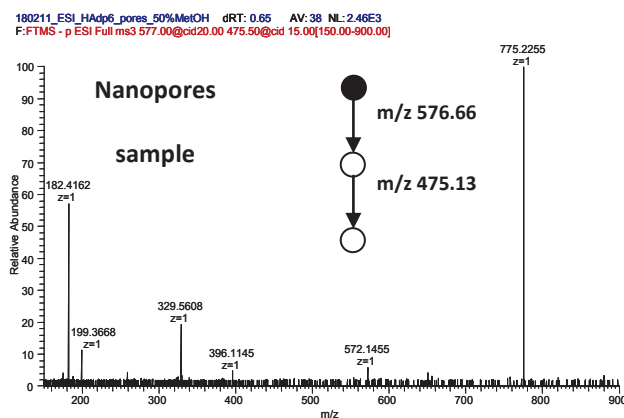
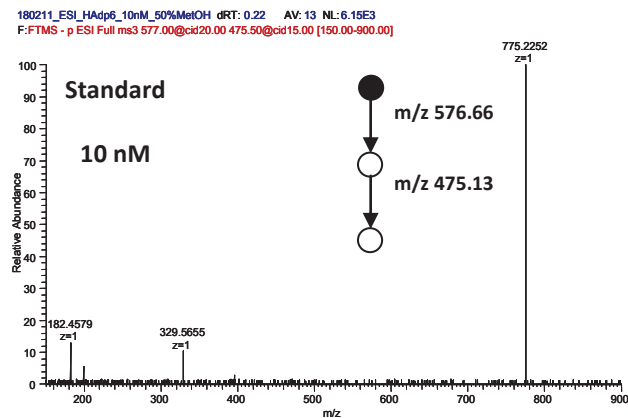
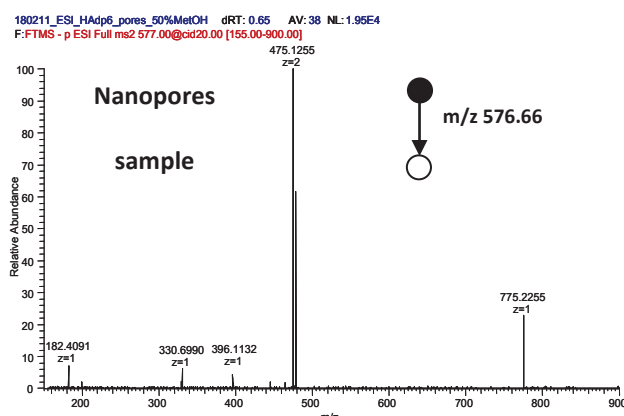
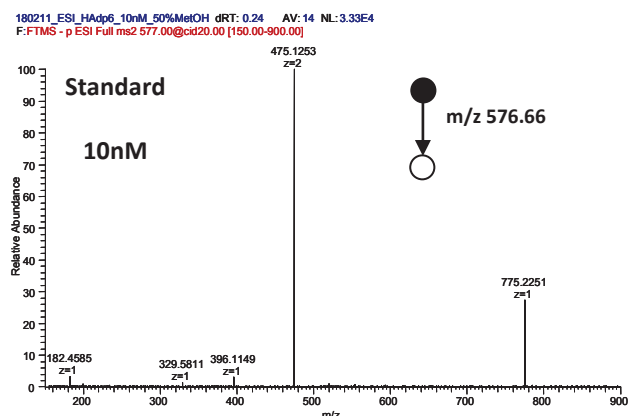
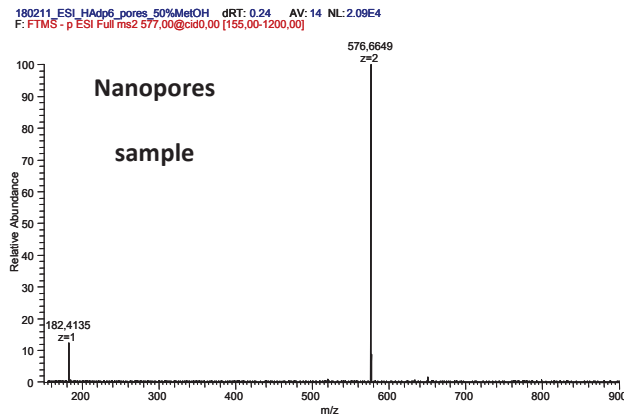
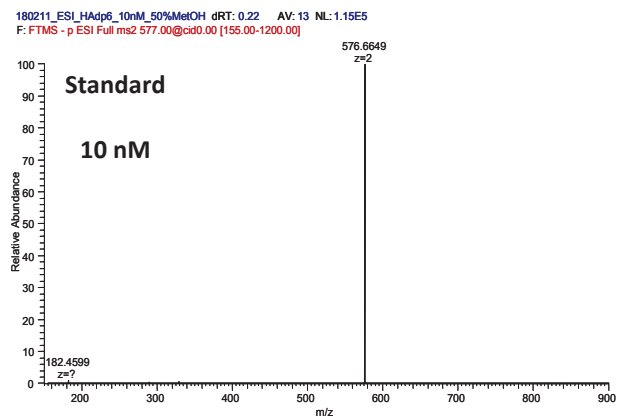


---

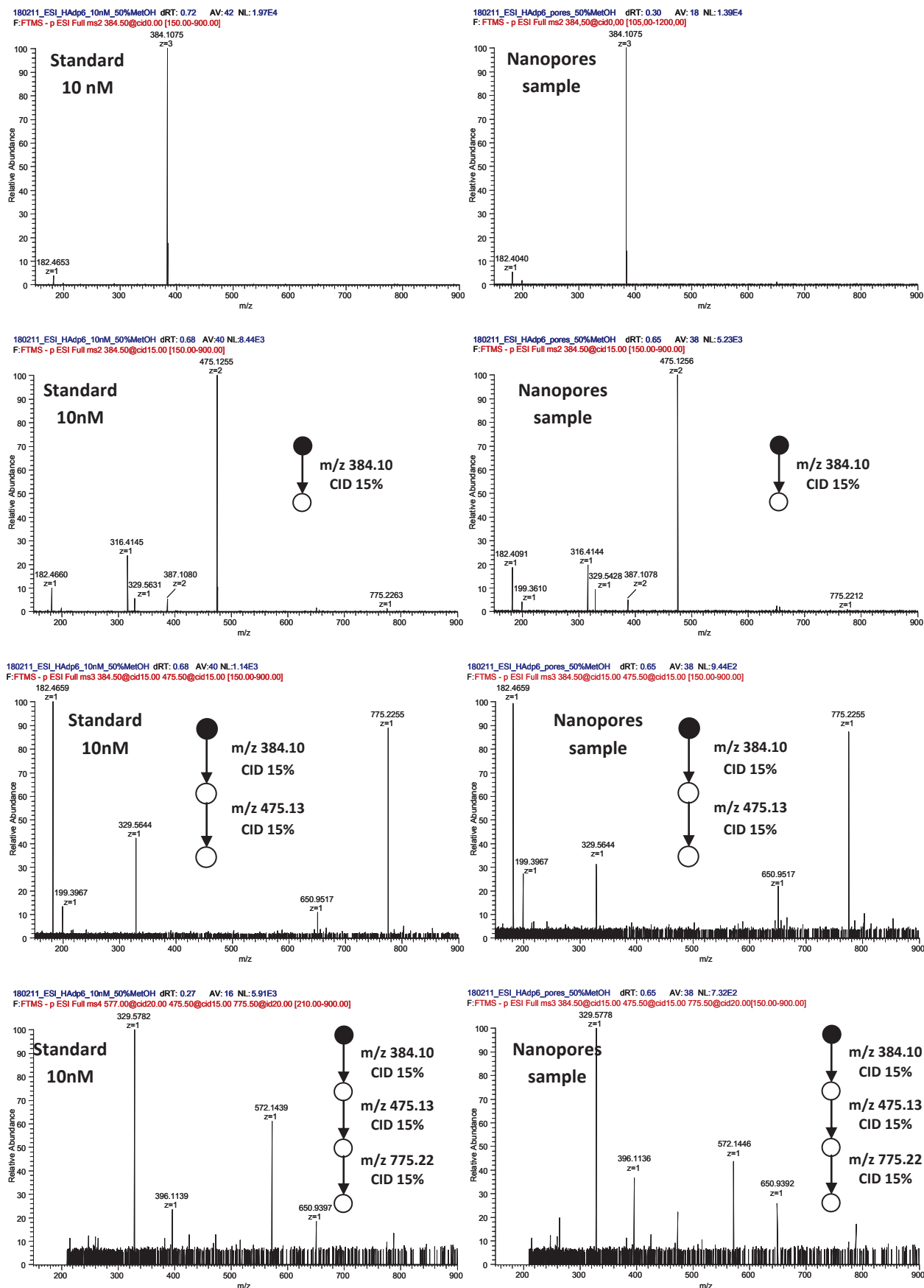
## Annexes

---





**Figure 128** : Fragmentation de l'ion chargé m/z 576.66, à gauche à partir d'une solution d'un standard de l'hexasaccharide, à droite à partir de l'échantillon récupéré du compartiment *trans*.



**Figure 129** : Fragmentation de l'ion trichargé m/z 384.10, à gauche à partir d'une solution d'un standard de l'hexasaccharide, à droite à partir de l'échantillon récupéré du compartiment *trans*.

---

## Publications

---



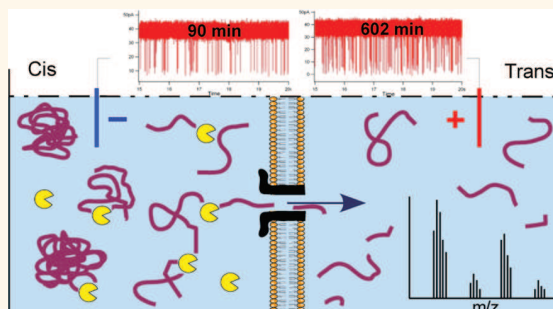


# Single Molecule Detection of Glycosaminoglycan Hyaluronic Acid Oligosaccharides and Depolymerization Enzyme Activity Using a Protein Nanopore

Aziz Fennouri,<sup>†</sup> Cédric Przybylski,<sup>†</sup> Manuela Pastoriza-Gallego,<sup>‡</sup> Laurent Bacri,<sup>†,\*</sup> Loïc Auvray,<sup>§</sup> and Régis Daniel<sup>†,\*</sup>

<sup>†</sup>CNRS UMR 8587, Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement, Université d'Evry Val d'Essonne, Bd François Mitterrand, 91025 Evry Cedex, France, <sup>‡</sup>CNRS UMR 8587, Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement, Université de Cergy-Pontoise, 2 avenue Adolphe Chauvin, 95302 Cergy-Pontoise Cedex, France, and <sup>§</sup>CNRS UMR 7057, Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, Université Paris Diderot, Paris, France

**ABSTRACT** Glycosaminoglycans are biologically active anionic carbohydrates that are among the most challenging biopolymers with regards to their structural analysis and functional assessment. The potential of newly introduced biosensors using protein nanopores that have been mainly described for nucleic acids and protein analysis to date, has been here applied to this polysaccharide-based third class of bioactive biopolymer. This nanopore approach has been harnessed in this study to analyze the hyaluronic acid glycosaminoglycan and its depolymerization-derived oligosaccharides. The translocation of a glycosaminoglycan is reported using aerolysin protein nanopore. Nanopore translocation of hyaluronic acid oligosaccharides was evidenced by the direct detection of translocated molecules accumulated into the arrival compartment using high-resolution mass spectrometry. Anionic oligosaccharides of various polymerization degrees were discriminated through measurement of the dwelling time and translocation frequency. This molecular sizing capability of the protein nanopore device allowed the real-time recording of the enzymatic cleavage of hyaluronic acid polysaccharide. The time-resolved detection of enzymatically produced oligosaccharides was carried out to monitor the depolymerization enzyme reaction at the single-molecule level.



**KEYWORDS:** nanopore · aerolysin · oligosaccharide · hyaluronic acid · enzyme · hyaluronidase · mass spectrometry

Nanometer-scale protein channels have been recently introduced as ultrasensitive biosensors allowing the detection and the characterization of various analytes at the single molecule level.<sup>1–3</sup> Mainly used for the analysis of proteins,<sup>4–6</sup> nucleic acids<sup>7,8</sup> and nonelectrolyte polymers,<sup>9–13</sup> the nanopore detection is a promising method for deciphering information encoded in linear polymers.<sup>14,15</sup> However this method has been rarely applied to carbohydrate,<sup>16</sup> especially bioactive polysaccharides. We recently reported the detection of nonionic oligosaccharides at the single-molecule level using a protein nanopore.<sup>17</sup> This approach allowed us to discriminate oligosaccharides according

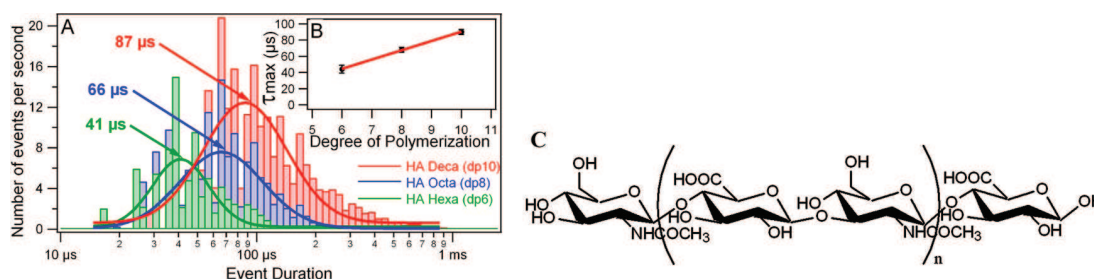
to their polymerization degree and glycosidic linkages. This method appears thus promising for the determination of structural features of oligosaccharides, particularly those derived from bioactive polysaccharides such as glycosaminoglycans (GAGs). GAGs are highly anionic linear polysaccharides expressed at the cell surface and in the extra-cellular matrix, which mediate cell–cell and cell–matrix interactions involved in a variety of physiological and pathological functions such as in embryonic development, cell growth and differentiation, homeostasis, inflammatory response, tumor growth, and microbial infection.<sup>18,19</sup> In the study herein, we report on the nanopore analysis of anionic oligosaccharides derived from

\* Address correspondence to regis.daniel@univ-evry.fr, laurent.bacri@univ-evry.fr.

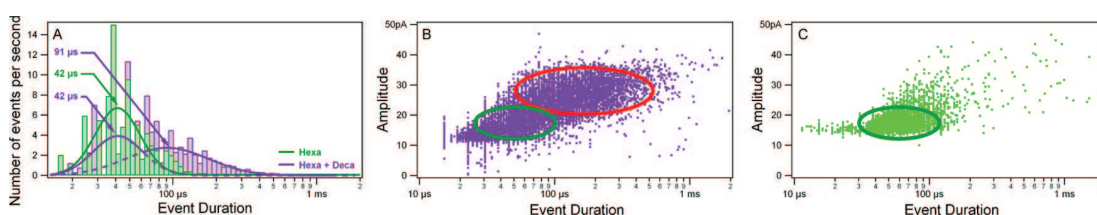
Received for review July 11, 2012 and accepted October 9, 2012.

Published online October 09, 2012 10.1021/nn3031047

© 2012 American Chemical Society



**Figure 1.** Dependence of the dwelling time on hyaluronic acid oligosaccharide size. (A) Distributions of the dwelling time of purified HA hexa-, octa-, and decasaccharide. Each distribution was fitted by a log-normal function, allowing the determination of the average dwelling time for each oligosaccharide. (B) Evolution of the average dwelling duration  $\tau$  according to the degree of polymerization. HA oligosaccharides were 1 mM in the cis compartment in 5 mM HEPES, 1 M KCl, pH 7.5. Trans-membrane potential = 70 mV. (C) Structure of hyaluronic acid oligosaccharide used in this study ( $n = 2, 3$ , and 4 for HA hexa-, octa-, and decasaccharide, respectively).



**Figure 2.** Distributions of the dwelling time of HA hexa- and decasaccharide in mixture. (A) Event duration distributions of HA hexa- and decasaccharide mixture (purple) and purified HA hexasaccharide (green). (B and C) Scatter plot representations of dwelling times for HA hexa- and decasaccharide mixture (B) and purified HA hexasaccharide (C). HA oligosaccharides were 0.5 mM each in the cis compartment in 5 mM HEPES, 1 M KCl, pH 7.5. Trans-membrane potential = 70 mV.

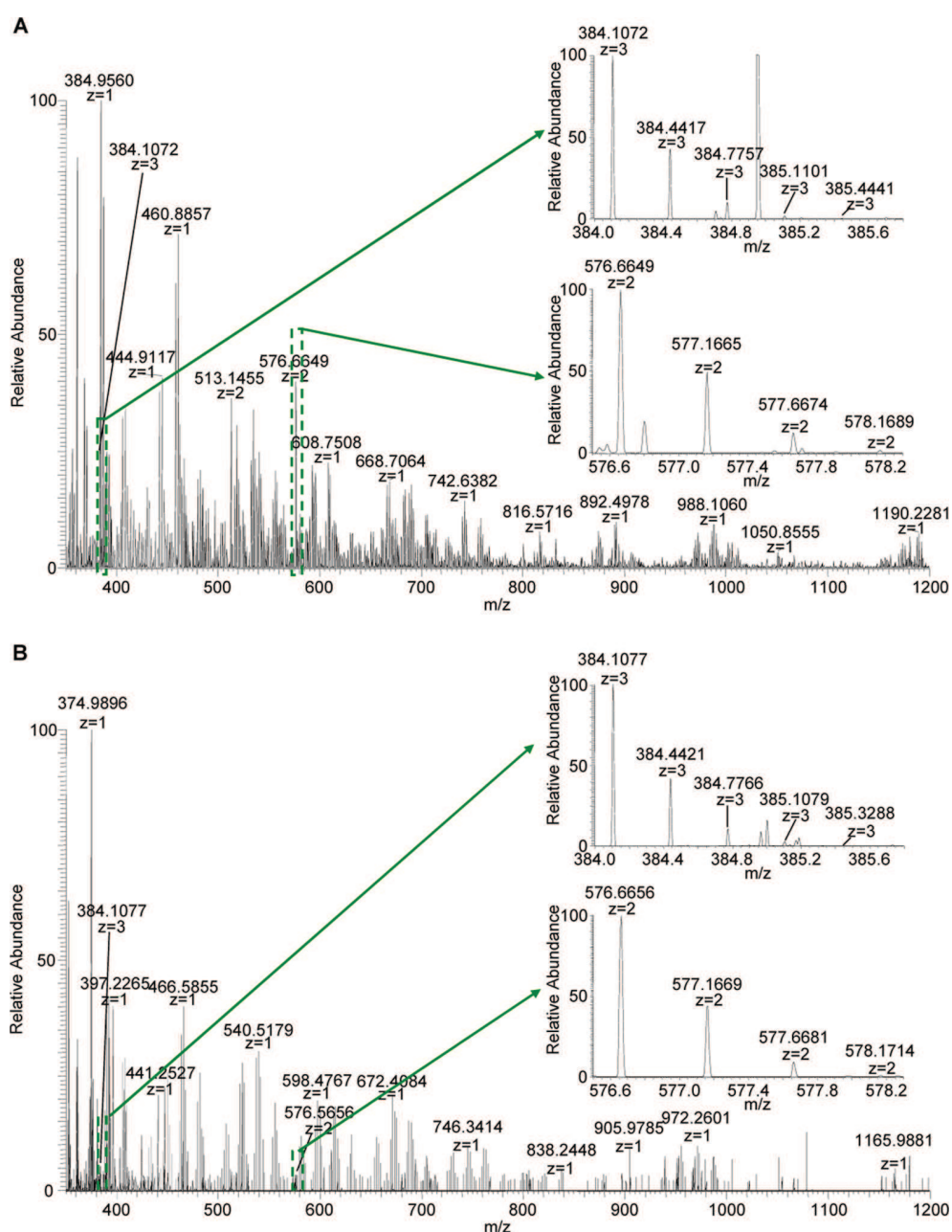
hyaluronic acid (HA), and the real-time nanopore recording of the enzymatic depolymerization of this glycosaminoglycan polysaccharide. HA is a linear polymer composed of disaccharide repeat units of D-glucuronic acid and N-acetyl glucosamine (Figure 1). As major GAGs in the extracellular matrix, HA plays an important role in normal tissue homeostasis, and in tissue remodeling during development and disease as well as in tumor progression.<sup>20</sup>

## RESULTS AND DISCUSSION

In a typical single nanopore experiment, two compartments filled with 5 mM HEPES, 1 M KCl pH 7.5, were separated by a lipid membrane, in which a single protein nanopore was inserted. This unitary nanopore was built from aerolysin, a toxin from *Aeromonas hydrophila* forming trans-membrane heptameric channels.<sup>21,22</sup> A 70 mV membrane potential was applied (cathode at the cis compartment), allowing the measurement of an ionic current of  $32 \pm 2$  pA in the absence of oligosaccharides, a current value corresponding thus to a single open pore. The addition of HA oligosaccharides in the cis compartment resulted in transient current decreases due to their interaction with the nanopore. These current blockades were characterized by their duration, frequency, and amplitude, which could be related to the structural features of a molecule dwelling within the nanopore.<sup>17</sup> We recorded here the distribution of event durations for

purified HA oligosaccharides of different polymerization degrees, that is, hexa- ( $1136.3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), octa- ( $1515.4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) and decasaccharide ( $1894.5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ). The data showed an increase of the average dwelling time  $\tau$  of oligosaccharides according to their polymerization degree (Figure 1), in agreement with previous studies on maltose and dextran oligosaccharides,<sup>17</sup> and poly(ethylene glycol) molecules.<sup>12,13</sup>

Although the average dwelling times of purified hexa- ( $44 \pm 5 \mu\text{s}$ ), octa- ( $68 \pm 3 \mu\text{s}$ ), and decasaccharide ( $90 \pm 3 \mu\text{s}$ ) were distinct for oligosaccharides differing by only one disaccharide repeat unit (Figure 1), differentiation of the oligosaccharides in a mixture was more complex and could be more confidently achieved for oligosaccharides differing by two disaccharide repeats as exemplified in Figure 2. The scatter plot of the duration distribution according to the amplitude of the current blockade for a mixture of hexa- and decasaccharide (0.5 mM each) showed two distinct populations (Figure 2B), one centered at 42  $\mu\text{s}$  (circled in green) and the second one of longer times centered at 91  $\mu\text{s}$  (circled in red). Both the same populations were also distinguished in the event distribution (purple distribution in Figure 2A), showing average duration times very close to purified hexa- and decasaccharide (overlay of the dwelling time distribution of purified hexasaccharide in green curve, Figure 2A). This result indicated that both populations at 42 and 90  $\mu\text{s}$  could be respectively attributed to hexasaccharide



**Figure 3.** Mass spectrometry detection and analysis of translocated HA hexasaccharide. Full negative ESI mass spectra of the trans compartment content upon hexasaccharide translocation experiment (A), and purified hexasaccharide (1 nM) (B). Inset: enlargement of spectra in mass range containing the two characteristic ions of HA hexasaccharide at  $m/z$  384.107 ( $z = 3$ ) and  $m/z$  576.665 ( $z = 2$ ). Direct infusion of 5  $\mu$ L of sample in water/methanol (1/1) solution.

and decasaccharide and they could be detected in the oligosaccharide mixture.

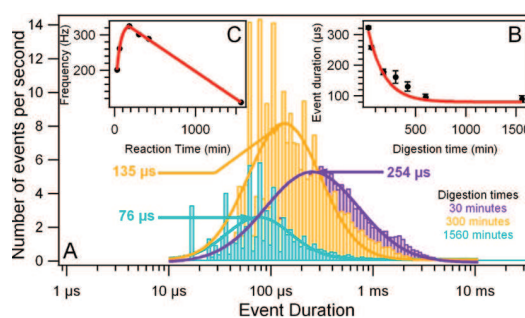
Evidence of the effective translocation of molecules through protein nanopores, leading to their accumulation into the trans compartment, is a recurrent issue in nanopore studies.<sup>14</sup> To address this issue, we have used electrospray mass spectrometry (ESI-MS) to achieve the sensitive detection of translocated HA hexasaccharide molecules in the trans compartment. For that purpose, a high-resolution linear ion trap–orbitrap hybrid ESI-LTQ–Orbitrap mass spectrometer

was used, allowing sensitive detection and accurate identification by tandem mass spectrometry (MS/MS) experiments. Trans compartment content corresponding to the pool of seven repeated translocation experiments was dialyzed and freeze-dried, and then analyzed by ESI-MS in negative ionization mode. The negative ion mass spectrum of the trans compartment clearly showed characteristic ions at  $m/z$  384.107 and 576.665 (Figure 3A) corresponding to tri- and di-charged species of HA hexasaccharide,<sup>23</sup> in full agreement with the spectrum of purified HA hexasaccharide

(Figure 3B). These diagnostic ions were not detected in the control experiment carried out without oligosaccharide in the cis-compartment (Supporting Information Figure S1). This identification was unambiguously ascertained by multistage fragmentation mass spectrometry  $MS^n$  ( $n = 2$  to 4) of these hexasaccharide ions, which led to characteristic fragments (Supporting Information Figures S2 and S3). The control experiment carried out in the absence of an aerolysin channel (oligosaccharides in the cis compartment) led to a mass spectrum devoid of any characteristic HA ions (data not shown), excluding any artifactual translocation of oligosaccharide in the trans compartment. These results showed the direct detection of translocated molecules by mass spectrometry and definitely evidenced translocation of molecules through a protein nanopore. In an attempt to estimate the amount of translocated hexasaccharide, the MS signal of the diagnostic ions was integrated over 1 min from hexasaccharide solutions at 1, 10, and 100 nM. A total of about 200 fmoles of translocated hexasaccharide was estimated in the pooled sample, in agreement with the overall number of recorded translocations events.

The ability of a nanopore to discriminate oligosaccharides at the single-molecule level opens promising analytical applications, notably when various oligosaccharides in mixture have to be distinguished. We took advantage of this capability to monitor the enzyme depolymerization of hyaluronic acid by hyaluronidase (EC 3.2.1.35), which catalyzes the hydrolysis of the  $\beta(1 \rightarrow 4)$  glycosidic bonds between D-glucuronic and N-acetyl-D-glucosamine residues. For that purpose, enzyme depolymerization was first performed outside the nanopore. Samples were withdrawn from the reaction mixture during the enzyme reaction, and then added to the cis compartment. The nanopore recording for each sample enabled the monitoring of the variation of duration and frequency of translocation events throughout the depolymerization reaction (Figure 4). It showed a decrease of the event duration upon the enzyme reaction time (Figure 4B), indicating a decrease of the polymerization degree of the translocated oligosaccharides as expected from the enzyme reaction progress. The average dwelling time was 254  $\mu s$  after 30 min reaction, suggesting the cleavage of the hyaluronic acid polymer into fragments larger than decasaccharide on average at the earlier stage of the enzyme reaction. The dwelling time reached a plateau at an average value of 76  $\mu s$  indicating the completion of the depolymerization and the accumulation of short oligosaccharides smaller than decasaccharide.

The event frequency (event/sec) is linked to the interaction of oligosaccharides with the pore entrance and depends on the concentration of the probed molecules in the cis compartment.<sup>9</sup> No event was recorded before the addition of the enzyme, indicating that none of the substrate molecules was able to

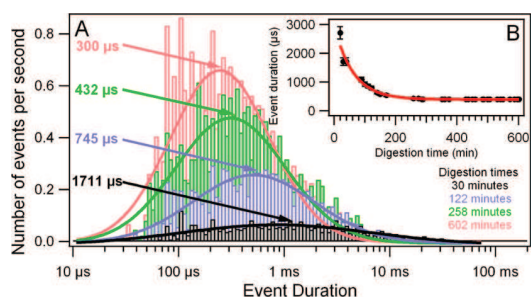


**Figure 4.** Nanopore recording of hyaluronidase activity. (A) Distribution of dwelling times upon progress of the depolymerization enzyme reaction. Event distributions at 0.5, 5, and 26 h of the enzyme reaction were fitted by a log-normal function allowing the determination of the corresponding average dwelling time. (B and C) Evolution of the average dwelling time and of the event frequency in the course of the enzyme reaction. Depolymerization enzyme reaction of hyaluronic acid (3 mg/mL) catalyzed by hyaluronidase (0.15 mg/mL) in 0.1 M NaAc, 0.15 M NaCl, pH 5.2, 37 °C.

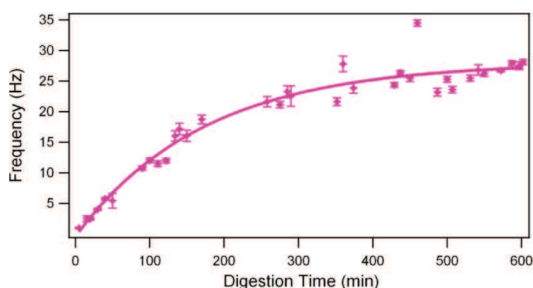
translocate through the nanopore as expected from the high molecular weight of hyaluronic acid polymer ( $1.63 \times 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ). The frequency rose to  $200 \pm 12 \text{ Hz}$  after 30 min of reaction (Figure 4C), indicating a concentration increase in the cis compartment of molecules that can be translocated across the nanopore. The subsequent frequency increases to  $260 \pm 10 \text{ Hz}$  at 60 min, and then to  $320 \pm 17 \text{ Hz}$  after 3 h reflected the reaction progress. In the meantime the concomitant decrease of dwelling time indicated the formation of shorter oligosaccharides. Beyond 5 h of reaction, event frequency decreased, meanwhile translocation duration still diminished. It is likely that the di- and tetrasaccharide limit products were mainly formed at this time of reaction. However, these short oligosaccharides could not be discerned from peak noise given their low polymerization degree, as previously observed with nanopore translocation of purified di- and tetrasaccharides.<sup>17</sup> Therefore, the measurement of event frequency is likely affected by loss of signal at this later time of reaction.

In an attempt to perform a real-time reaction monitoring, the enzyme depolymerization was directly carried out in the cis compartment containing the polysaccharide substrate. For that purpose, enzyme reaction conditions were adapted to allow nanopore translocation and detection, that is using a lower temperature (21 °C in the nanopore device instead of 37 °C) and a higher ionic strength (1 M KCl instead of 0.15 M NaCl). No translocation event was detected before the addition of hyaluronidase to the cis compartment given the high molecular weight of hyaluronic acid. Shortly after hyaluronidase addition, few events of long time duration (millisecond range) were recorded, suggesting the translocation of HA long fragments. Afterward, event frequency greatly rose in parallel with a decrease of the dwelling time along the reaction progress (Supporting Information, Figure S4),





**Figure 5.** *In situ* real-time nanopore recording of hyaluronidase enzyme activity. (A) Distribution of dwelling times upon progress of the depolymerization enzyme reaction that was directly conducted in cis compartment. Average dwelling times were determined at 30, 122, 258, and 602 min of the reaction course. (B) Evolution of the average dwelling time in the course of enzyme reaction. Depolymerization enzyme reaction of hyaluronic acid (0.75 mg/mL) catalyzed by hyaluronidase (0.075 mg/mL) in 800  $\mu$ L of 0.1 M sodium acetate buffer, 0.15 M NaCl, pH 5.2 added to 200  $\mu$ L of 4.5 M KCl, 5 mM HEPES, pH 7.5, 21  $^{\circ}$ C.



**Figure 6.** Variation of event frequency during the hyaluronidase-catalyzed HA depolymerization conducted in the cis compartment. Increase of the event frequency all along the enzyme reaction progress showing the increase of the concentration of smaller oligosaccharides in the cis compartment. Depolymerization enzyme reaction of hyaluronic acid (0.75 mg/mL) catalyzed by hyaluronidase (0.075 mg/mL) in 800  $\mu$ L of 0.1 M NaAc, 0.15 M NaCl, added to 200  $\mu$ L of 4.5 M KCl, 5 mM HEPES, pH 7.5, 21  $^{\circ}$ C.

indicating a concentration increase of HA fragments in the cis compartment along with the decrease of their size (Figure 5).

It is worth noting that an average dwelling time of 300  $\mu$ s was reached after 10 h reaction, while a near value (254  $\mu$ s) was recorded after only 30 min during the reaction achieved outside the nanopore (Figure 4). This feature pointed to a lower reaction rate of hyaluronidase in the cis compartment, likely due to the lower temperature and the high ionic strength used in the nanopore device, as confirmed by the spectrophotometric assay of the hyaluronidase reaction (Supporting

Information Figure S5). Nevertheless, this result evidenced the feasibility of a real-time monitoring of the hyaluronidase-catalyzed HA depolymerization in the conditions required by nanopore translocation and recording. The variation of the event frequency resulting from the increase of reaction products in the cis compartment led to a classic progress curve for an enzyme reaction (Figure 6), allowing the monitoring of depolymerization kinetics at the single-molecule level.

## SUMMARY

The translocation of a glycosaminoglycan, hyaluronic acid, through a protein nanopore was observed for the first time. So far, the main evidence for molecule translocation relied mainly on the recording of ionic current variation, since the direct detection of translocated molecules in the trans compartment remains a difficult task due to the inherent low number of translocated molecules. Indirect detection based on an amplification procedure such as PCR has been previously reported for the detection of translocated single-stranded DNA,<sup>14</sup> but such amplification tool is not available for carbohydrates. Here, mass spectrometry analysis was applied for the first time to achieve the direct detection of translocated hyaluronic acid oligosaccharides. The anionic oligosaccharides could be discriminated according to their size through measurement of the dwelling time and event frequency, supporting the potential of nanometer-scale pores for mass spectrometry applications.<sup>12,13</sup> This molecular sieve feature of protein nanopores allowed us to follow the formation of oligosaccharides arising from the enzymatic depolymerization of hyaluronic acid polysaccharide. Single molecule detection of enzyme activity is an emerging application in the field of nanopore biosensors as recently reported for DNA polymerase and peptidase,<sup>14,24,25</sup> yet never described for carbohydrates. Here, the time-resolved recording of ionic current variation arising from the enzyme reaction on a glycosaminoglycan substrate allowed the real-time monitoring of hyaluronidase. GAGs have been recently considered as important biomarkers in metabolic disorders, cancer, and inflammatory and immune diseases.<sup>26,27</sup> These reported results support the nanopore tool as a valuable label-free approach for the detection and characterization of such GAGs biomarkers, which today remain a challenging task in glycosciences.

## METHODS

**Preparation of Hyaluronic Acid Oligosaccharides.** Hyaluronic acid hexa- to decasaccharide (HA-dp6 to HA-dp10, dp = degree of polymerization) was prepared from enzyme digestion of hyaluronic acid sodium salt from *Streptococcus equi* (Sigma) by bovine testes hyaluronidase (E.C. 3.2.1.35, Sigma) as previously

described.<sup>28</sup> Briefly, 3 mg of hyaluronic acid was solubilized in 1 mL of buffer containing sodium acetate 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 5.2. The solution was shaken for 1 h and let overnight at 4  $^{\circ}$ C to provide a complete dissolution. This solution was heated at 37  $^{\circ}$ C for 30 min. Finally, 0.15 mg of hyaluronidase was added and the solution was incubated at 37  $^{\circ}$ C for 5 h.

Digestion products were then size-separated using a Bio-Gel P6 column (Bio-Rad;  $5 \times 100$  cm) equilibrated with  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0.2 M (pH 8.3) and run at 1 mL/min. Elution performed using the same buffer was followed by refractive index detection (RI-71, Merck). Each isolated oligosaccharide fraction from tetra- to decasaccharide was freeze-dried with two intermediate lyophilization steps, and then suspended in ultrapure water and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Ultrapure water (Milli-Q, Millipore, Milford, USA) was used. Other chemicals and reagents were obtained from commercial sources at the highest purity available.

#### Single Nanopore Formation and Recording of Oligosaccharide Transit.

In a typical single nanopore experiment, two compartments filled with buffered electrolyte were separated by a lipid bilayer. The membrane lipid bilayer was formed according to a previously described method, using 1% of diphytanoyl phosphatidylcholine—lecithine (Avanti Polar Lipids) in decane (SDS).<sup>29</sup> The lipid solution was spread over an aperture 90 nm in diameter size perforated in a polysulfone plate (Warner Instruments, USA). The planar bilayer was formed upon thinning of the decane film at room temperature. The polysulfone plate was then inserted in a device divided in two compartments, cis and trans (the cis compartment is connected to the ground). Both compartments were filled with 1 mL of 5 mM Hepes and 1 M KCl pH 7.5. A 70 mV potential was applied, using Ag—AgCl electrodes in contact with the electrolyte within each compartment. The lipid membrane was then thinned until having  $65 \pm 5$  pF capacitance corresponding to  $4.85 \pm 0.4$  nm in thickness. The formation of a single protein nanopore was initiated by the addition of 2  $\mu\text{L}$  of 3  $\mu\text{M}$  aerolysin to the cis-compartment.<sup>6</sup> Aerolysin was produced in *Escherichia coli* as proaerolysin as described previously.<sup>30,31</sup> It was activated by digestion with trypsin 10 min at room temperature prior to introduction in the cis-compartment to eliminate propeptide sequence and to allow polymerization of the aerolysin monomer.<sup>32</sup> A 70 mV potential was applied, and the ionic current through the pore was measured by a Dagan current amplifier, filtered at 10 kHz and sampled at 200 kHz. Under these conditions, an ionic current of  $I_0 = 32 \pm 2$  pA was recorded indicating that a single nanopore was inserted in the membrane. This current value corresponded to the open pore in an unoccupied state.

For the nanotransit experiment, 100  $\mu\text{M}$  purified oligosaccharide was added to the cis-compartment containing 5 mM Hepes buffer, 1 M KCl pH 7.5. The addition of oligosaccharides in the cis compartment resulted in transient current decreases due to interaction of the sugars with the nanopore. The current blockades were characterized according to the following parameters, duration, frequency, and amplitude, which were determined for each purified oligosaccharide ranging from hexa- to decasaccharide. Current traces were analyzed with Igor Pro software (WaveMetrics, USA).

**Nanopore Recording of Hyaluronic Acid Depolymerization Catalyzed by Hyaluronidase.** Aliquots were withdrawn from the reaction mixture during the enzyme depolymerization of hyaluronic acid performed as above-described.<sup>28</sup> The reaction was stopped by heating the aliquots at  $100^\circ\text{C}$  for 1 min. Then, a 800  $\mu\text{L}$  aliquot was mixed with 200  $\mu\text{L}$  of 4.5 M KCl, 5 mM HEPES, pH 7.5, and the mixture was added to the cis compartment at ambient temperature. Alternatively, enzyme depolymerization of hyaluronic acid was directly performed into the cis compartment to record the real-time progress of the enzyme reaction. For that purpose, the cis compartment was filled with 800  $\mu\text{L}$  of 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  hyaluronic acid in 0.1 M sodium acetate, 0.15 M NaCl, pH 5.2 mixed to 200  $\mu\text{L}$  of 4.5 M KCl, 5 mM HEPES, pH 7.5. The enzyme reaction was initiated by the addition of 7.5  $\mu\text{g}$  hyaluronidase. A 70 mV potential was applied, and the ionic current was measured all along the enzyme reaction.

**Spectrophotometric Assay of Hyaluronic Acid Depolymerization.** The assay solution was composed of 1 mL of 3 mg/mL hyaluronic acid, in 0.1 M sodium acetate buffer, NaCl 0.15 M, pH 5.2. Enzyme depolymerization was initiated by the addition of 15  $\mu\text{L}$  of 0.1 mg/mL hyaluronidase, and the reaction mixture was incubated at  $37^\circ\text{C}$ . For comparison purposes, the enzyme reaction was also carried out in conditions used for the real-time recording in the cis compartment. Assay solution was

composed of 800  $\mu\text{L}$  of 1 mg/mL hyaluronic acid, in 0.1 M sodium acetate buffer, NaCl 0.15 M, pH 5.2 HA mixed to 200  $\mu\text{L}$  of 4.5 M KCl, 5 mM HEPES, pH 7.5. Enzyme depolymerization was initiated by the addition of 7.5  $\mu\text{g}$  of hyaluronidase, and the reaction mixture was incubated at  $21^\circ\text{C}$ .

Samples were withdrawn all along the enzyme reaction and heated at  $100^\circ\text{C}$  for enzyme inactivation. 30  $\mu\text{L}$  of 1/200 (reaction at  $37^\circ\text{C}$ ) or 1/100 (reaction at  $21^\circ\text{C}$ ) diluted samples were mixed with 30  $\mu\text{L}$  of 1.1 mg/mL WST-1 reagent (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolol]-1,3-benzene disulfonate, water-soluble tetrazolium salt WST-1, Fisher scientific) in 0.1 M NaOH. The absorbance at 584 nm was then measured after incubation at  $60^\circ\text{C}$  for 60 min (Supporting Information, Figure S5).<sup>33</sup>

**ESI-LTQ-Orbitrap Mass Spectrometry Analysis of Translocated Oligosaccharide Molecules in Trans-Compartment.** The trans-compartment content corresponding to 7 consecutive translocation experiments of hyaluronic acid hexasaccharide was pooled and gel filtrated on Sephadex G-25 column equilibrated in water beforehand (PD MidiTrap G-10, GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The desalted sample was freeze-dried and suspended in 15  $\mu\text{L}$  of a water/methanol 1/1 mixture prior to ESI-MS analysis. A control experiment was carried out without oligosaccharide in the cis-compartment (Supporting Information, Figure S1).

ESI-MS experiments were carried out using a LTQ-Orbitrap XL from Thermo Scientific (San Jose, CA, USA) and operated in negative ionization mode, with a spray voltage at  $-3$  kV, and a sheath gas flow rate of 11 arbitrary units. A water/methanol 1/1 mixture was continuously infused using a 250  $\mu\text{L}$ -syringe at 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  flow rate through a 10  $\mu\text{L}$  loop. A 5  $\mu\text{L}$  sample in water/methanol 1/1 was injected, providing a consistent signal for at least 1 min. Applied voltages were  $-19$  and  $-120$  V for the ion transfer capillary and the tube lens, respectively. The ion transfer capillary was held at  $275^\circ\text{C}$ . Resolution was set to 30 000 (at  $m/z$  400) for all studies, and the  $m/z$  ranges were set to 300–1200 in profile mode and in the high mass range during full scan experiments. Spectra were analyzed using the acquisition software XCalibur 2.0.7 (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), without smoothing and background subtracts. During MS/MS scans, collision induce dissociation (CID) fragmentation occurred in the linear ion trap analyzer and detection in Orbitrap with centroid mode. For CID fragmentation, an activation  $Q$  value ( $Q$ ) of 0.25 and an activation time ( $T$ ) equal to 30 ms were used. Normalized collision energy (NCE) was set at 20% (MS/MS), 15% (MS<sup>3</sup>), and 20% for MS<sup>4</sup> for the doubly charged species, and at 15% for all MS <sup>$n$</sup>  (with  $n = 2$  to 4) steps for the triply charged species.

The automatic gain control (AGC) allowed accumulation up to  $1 \times 10^6$  ions for FTMS scans,  $2 \times 10^5$  ions for FTMS <sup>$n$</sup>  scans and  $1 \times 10^4$  ions for ITMS <sup>$n$</sup>  scans. Maximum injection time was set to 500 ms for both FTMS and FTMS <sup>$n$</sup>  scans and 100 ms for ITMS <sup>$n$</sup>  scans. For all scan modes, 1 microscan was acquired. The precursor selection window was 2 Da during MS<sup>2</sup> experiments. Supporting Information, Figures S3 and S4 display negative mass spectra upon sequential fragmentation of translocated hyaluronic hexasaccharide.

**Conflict of Interest:** The authors declare no competing financial interest.

**Acknowledgment.** The authors acknowledge Ecole Doctorale Des Genomes Aux Organismes for a grant to A.F. We are grateful to C. Huin for assistance and J. Mathé for useful advices and interesting discussions.

**Supporting Information Available:** Multistage fragmentation mass spectrometry MS <sup>$n$</sup>  of hyaluronic acid hexasaccharide and spectrophotometric assay of hyaluronidase. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## REFERENCES AND NOTES

- Bayley, H.; Cremer, P. S. Stochastic Sensors Inspired by Biology. *Nature* **2001**, *413*, 226–230.
- Wang, H.; Branton, D. Nanopores with a Spark for Single-Molecule Detection. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 622–623.
- Kasianowicz, J. J.; Robertson, J. W.; Chan, E. R.; Reiner, J. E.; Stanford, V. M. Nanoscopic Porous Sensors. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, *1*, 737–766.



4. Movileanu, L.; Schmittschmitt, J. P.; Scholtz, J. M.; Bayley, H. Interactions of Peptides with a Protein Pore. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 1030–1045.
5. Oukhaled, G.; Mathé, J.; Biance, A. L.; Bacri, L.; Betton, J. M.; Lairez, D.; Pelta, J.; Auvray, L. Unfolding of Proteins and Long Transient Conformations Detected by Single Nanopore Recording. *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *98*, 158101.1–158101.4.
6. Pastoriza-Gallego, M.; Rabah, L.; Gibrat, G.; Thiebot, B.; van der Goot, F. G.; Auvray, L.; Betton, J. M.; Pelta, J. Dynamics of Unfolded Protein Transport through an Aerolysin Pore. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2923–2931.
7. Deamer, D. W.; Branton, D. Characterization of Nucleic Acids by Nanopore Analysis. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 817–825.
8. Venkatesan, B. M.; Bashir, R. Nanopore Sensors for Nucleic Acid Analysis. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 615–624.
9. Movileanu, L.; Cheley, S.; Bayley, H. Partitioning of Individual Flexible Polymers into a Nanoscopic Protein Pore. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 897–910.
10. Oukhaled, A. G.; Biance, A. L.; Pelta, J.; Auvray, L.; Bacri, L. Transport of Long Neutral Polymers in the Semidilute Regime through a Protein Nanopore. *Phys. Rev. Lett.* **2012**, *108*, 088104.1.
11. Bezrukov, S. M.; Vodyanov, I.; Brutyan, R. A.; Kasianowicz, J. J. Dynamics and Free Energy of Polymers Partitioning into a Nanoscale Pore. *Macromolecules* **1996**, *29*, 8517–8522.
12. Robertson, J. W.; Rodrigues, C. G.; Stanford, V. M.; Robinson, K. A.; Krasilnikov, O. V.; Kasianowicz, J. J. Single-Molecule Mass Spectrometry in Solution Using a Solitary Nanopore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 8207–8211.
13. Reiner, J. E.; Kasianowicz, J. J.; Nablo, B. J.; Robertson, J. W. F. Theory for Polymer Analysis Using Nanopore-Based Single-Molecule Mass Spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 12080–12085.
14. Kasianowicz, J. J.; Brandin, E.; Branton, D.; Deamer, D. W. Characterization of Individual Polynucleotide Molecules Using a Membrane Channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 13770–13773.
15. Akeson, M.; Branton, D.; Kasianowicz, J. J.; Brandin, E.; Deamer, D. W. Microsecond Time-Scale Discrimination among Polycytidylic Acid, Polyadenylic Acid, and Polyuridylic Acid as Homopolymers or as Segments within Single RNA Molecules. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 3227–3233.
16. Kullman, L.; Winterhalter, M.; Bezrukov, S. M. Transport of Maltodextrins through Maltoporin: A Single-Channel Study. *Biophys. J.* **2002**, *82*, 803–812.
17. Bacri, L.; Oukhaled, A.; Hémon, E.; Bassafoula, F. B.; Auvray, L.; Daniel, R. Discrimination of Neutral Oligosaccharides through a Nanopore. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *412*, 561–4.
18. Bishop, J. R.; Schuksz, M.; Esko, J. D. Heparan Sulphate Proteoglycans Fine-Tune Mammalian Physiology. *Nature* **2007**, *446*, 1030–1037.
19. Afratis, N.; Gialeli, C.; Nikitovic, D.; Tseggenidis, T.; Karousou, E.; Theocharis, A. D.; Pavão, M. S.; Tzanakakis, G. N.; Karamanos, N. K. Glycosaminoglycans: Key Players in Cancer Cell Biology and Treatment. *FEBS J.* **2012**, *279*, 1177–1197.
20. Day, A. J.; Prestwich, G. D. Hyaluronan-Binding Proteins: Tying Up the Giant. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 4585–4588.
21. Parker, M. W.; Buckley, J. T.; Postma, J. P.; Tucker, A. D.; Leonard, K.; Pattus, F.; Tsernoglou, D. Structure of the Aeromonas Toxin Proaerolysin in Its Water-Soluble and Membrane-Channel States. *Nature* **1994**, *367*, 292–295.
22. van der Goot, F. G.; Pattus, F.; Wong, K. R.; Buckley, J. T. Oligomerization of the Channel-Forming Toxin Aerolysin Precedes Insertion into Lipid Bilayers. *Biochemistry* **1993**, *32*, 2636–2642.
23. Przybylski, C.; Gonnet, F.; Buchmann, W.; Daniel, R. Critical Parameters for the Analysis of Anionic Oligosaccharides by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2012**, *47*, 1047–1058.
24. Chu, J.; González-López, M.; Cockroft, S. L.; Amarin, M.; Ghadiri, M. R. Real-Time Monitoring of DNA Polymerase Function and Stepwise Single-Nucleotide DNA Strand Translocation through a Protein Nanopore. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 10106–10109.
25. Zhao, Q.; de Zoysa, R. S.; Wang, D.; Jayawardhana, D. A.; Guan, X. Real-Time Monitoring of Peptide Cleavage Using a Nanopore Probe. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6324–6325.
26. Takahashi, R.; Negishi, K.; Watanabe, A.; Arai, M.; Naganuma, F.; Ohyama, Y.; Kurabayashi, M. Serum Syndecan-4 Is a Novel Biomarker for Patients with Chronic Heart Failure. *J. Cardiol.* **2011**, *57*, 325–332.
27. Lawrence, R.; Brown, J. R.; Al-Mafraji, K.; Lamanna, W. C.; Beitel, J. R.; Boons, G. J.; Esko, J. D.; Crawford, B. E. Disease-Specific Non-reducing End Carbohydrate Biomarkers for Mucopolysaccharidoses. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 197–204.
28. Price, K. N.; Tuinman, A.; Baker, D. C.; Chisena, C.; Cysyk, R. L. Isolation and Characterization by Electrospray-Ionization Mass Spectrometry and High-Performance Anion-Exchange Chromatography of Oligosaccharides Derived from Hyaluronic Acid by Hyaluronate Lyase Digestion: Observation of Some Heretofore Unobserved Oligosaccharides That Contain an Odd Number of Units. *Carbohydr. Res.* **1997**, *303*, 303–311.
29. Mueller, P.; Rudin, D. O.; Tien, H. T.; Wescott, W. C. Methods for the Formation of Single Bimolecular Lipid Membranes in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem.* **1963**, *67*, 534–535.
30. Howard, S. P.; Buckley, J. T. Molecular Cloning and Expression in *Escherichia Coli* of the Structural Gene for the Hemolytic Toxin Aerolysin from *Aeromonas Hydrophila*. *Mol. Gen. Genet.* **1986**, *204*, 289–295.
31. Moniatte, M.; van der Goot, F. G.; Buckley, J. T.; Pattus, F.; van Dorsselaer, A. Characterisation of the Heptameric Pore-Forming Complex of the Aeromonas Toxin Aerolysin Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *FEBS Lett.* **1996**, *384*, 269–272.
32. Cabiaux, V.; Buckley, J. T.; Wattiez, R.; Ruysschaert, J. M.; Parker, M. W.; van der Goot, F. G. Conformational Changes in Aerolysin During the Transition from the Water-Soluble Protoxin to the Membrane Channel. *Biochemistry* **1997**, *36*, 15224–15232.
33. Hammond, E.; Li, C. P.; Ferro, V. Development of a Colorimetric Assay for Heparanase Activity Suitable for Kinetic Analysis and Inhibitor Screening. *Anal. Biochem.* **2010**, *396*, 112–116.

# Kinetics of Enzymatic Degradation of High Molecular Weight Polysaccharides through a Nanopore: Experiments and Data-Modeling

Aziz Fennouri,<sup>†,‡</sup> Régis Daniel,<sup>\*,‡</sup> Manuela Pastoriza-Gallego,<sup>§</sup> Loïc Auvray,<sup>||</sup> Juan Pelta,<sup>†</sup> and Laurent Bacri<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Université d'Évry Val d'Essonne, Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement, F-91025 Evry, France

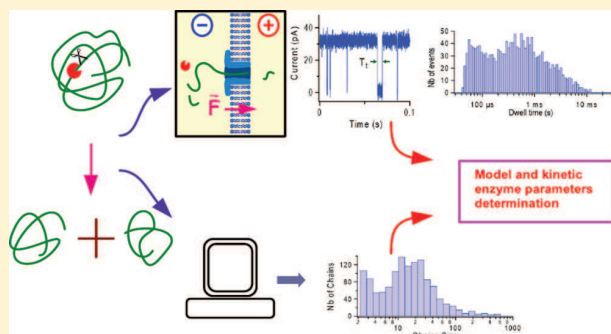
<sup>‡</sup>CNRS UMR 8587, Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement, F-91025 Evry, France

<sup>§</sup>Université de Cergy-Pontoise, Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement, F-95302 Cergy-Pontoise, France

<sup>||</sup>CNRS UMR 7057, Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, Université Paris Diderot, F-75205 Paris, France

## S Supporting Information

**ABSTRACT:** The enzymatic degradation of long polysaccharide chains is monitored by nanopore detection. It follows a Michaelis–Menten mechanism. We measure the corresponding kinetic constants at the single molecule level. The simulation results of the degradation process allowed one to account for the oligosaccharide size distribution detected by a nanopore.



Enzymatic reactions are involved in many fundamental biological<sup>1,2</sup> or industrial processes<sup>3</sup> and human diseases.<sup>4</sup> Up until now, few works have been performed with a nanopore to monitor enzymatic activities on biomolecules: the authors have probed the cleavage of poly[U] by a ribonuclease A,<sup>5,6</sup> the DNA replication,<sup>7</sup> the conductance modification of a gramicidin channel by an alkaline phosphatase,<sup>8</sup> and the enzymatic digestion by proteases of the amyloid- $\beta$  peptide<sup>9</sup> and serum immunoglobulin.<sup>10</sup> Regarding carbohydrates, we have recently reported the use of a nanopore to monitor the label-free enzyme depolymerization of glycosaminoglycan polysaccharides.<sup>11</sup>

Aerolysin nanopore coupled with an electric detection have been successfully used to study peptide structure,<sup>12</sup> dynamics of unfolded proteins,<sup>13</sup> wild type and mutant protein unfolding,<sup>14–16</sup> and more rarely carbohydrate<sup>11,17,18</sup> translocation. It is 10 nm long. Its diameter is approximately 1–1.7 nm large,<sup>19</sup> i.e., slightly narrower than the usual  $\alpha$ -Hemolysin protein nanopore.<sup>20</sup>

The determination of kinetic parameters upon enzyme depolymerization of high-molecular weight biomolecules such as glycosaminoglycan polysaccharides has not been studied using nanopores. Here, we focus on the enzyme degradation of hyaluronic acid (HA) polysaccharide, an essential component of the extracellular matrix<sup>21,22</sup> in particular in cartilage tissue. In our previous study, we have shown an increase of event

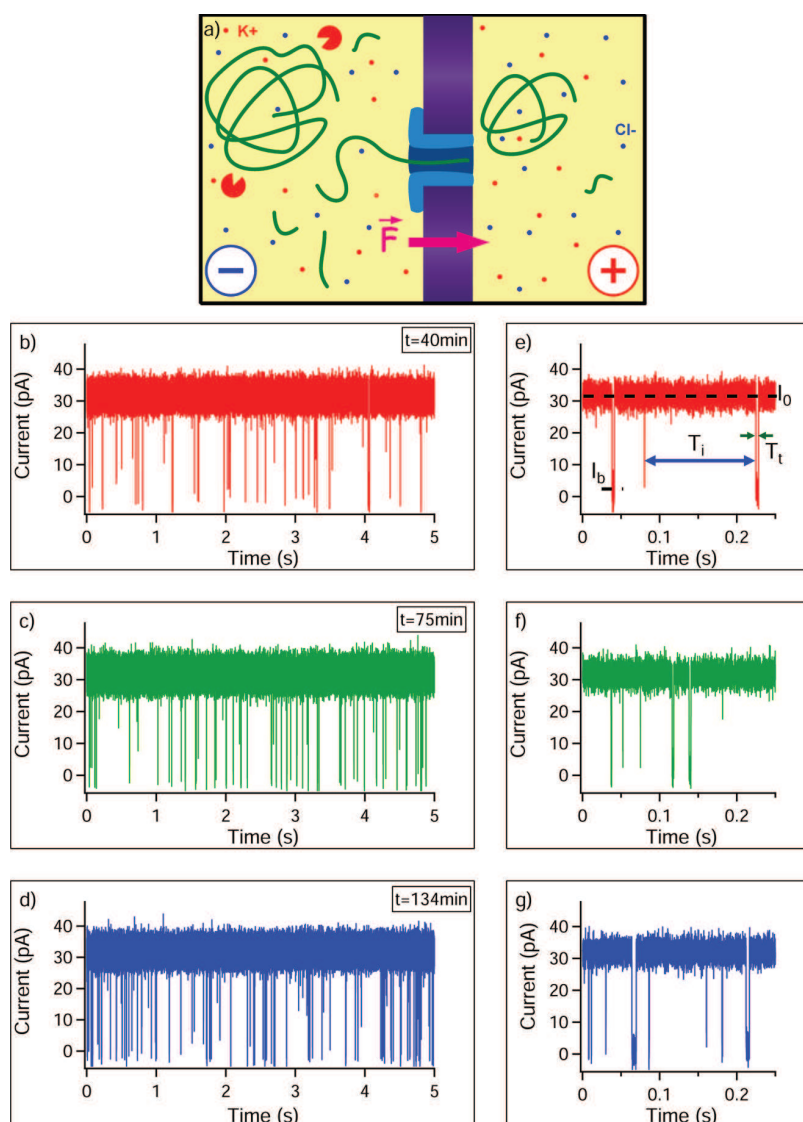
frequency and the discrimination of the produced oligosaccharides according to their polymerization degree as the enzyme depolymerization of HA progressed.<sup>11</sup> Nevertheless, the data were not interpreted according to a kinetic model.

In the Letter herein, we study the kinetics of the polysaccharide degradation catalyzed by hyaluronidase (EC 3.2.1.35) as a function of substrate concentration using an aerolysin nanopore. On the basis of current blockade frequency measurements, we determine the kinetic parameters of the enzyme depolymerization through the single molecule detection of the reaction products. We show that the recording of the enzymatic degradation of high molecular weight polysaccharides through a nanopore can be ascribed to a Michaelis–Menten model. These results are correlated with parallel bulk measurements. On the basis of a model describing the degradation process<sup>25</sup> and taking into account that a produced oligosaccharide becomes in turn a substrate molecule, we have estimated the theoretical chain size distribution and compared them to the experimental dwell time distribution. Experimental and modeled distributions are well correlated. This result shows that the nanopore technique could be generalized to any enzymatic cleavage and not only to small size

**Received:** July 9, 2013

**Accepted:** August 30, 2013

**Published:** August 30, 2013



**Figure 1.** Monitoring of depolymerization of hyaluronic acid: (a) experimental setup. The voltage (70 mV) is applied between two Ag/AgCl electrodes. We measure the ionic current through an aerolysin channel during the enzymatic degradation of  $0.35 \mu\text{M}$  hyaluronic acid in the presence of 112 U hyaluronidase in a 0.08 M NaAc, 0.12 M NaCl, 0.9 M KCl, 1 mM HEPES buffer,  $T = 21^\circ\text{C}$ . (b, c, d) Recorded current traces at various reaction times,  $t = 40$  min,  $t = 75$  min, and  $t = 134$  min, respectively. (e) Zoom of the current trace at  $t = 40$  min.  $I_0$  is the average open pore current,  $I_b$  the blockade current,  $T_i$  the interevent time between two current blockades,  $T_t$  the duration of each blockade. (f, g) Zoom of the current traces at  $t = 75$  and 134 min.

substrate molecules.<sup>5,9</sup> The nanopore is used as a “nano” mass spectrometer by considering the size distributions of the several kinds of degraded polysaccharides.

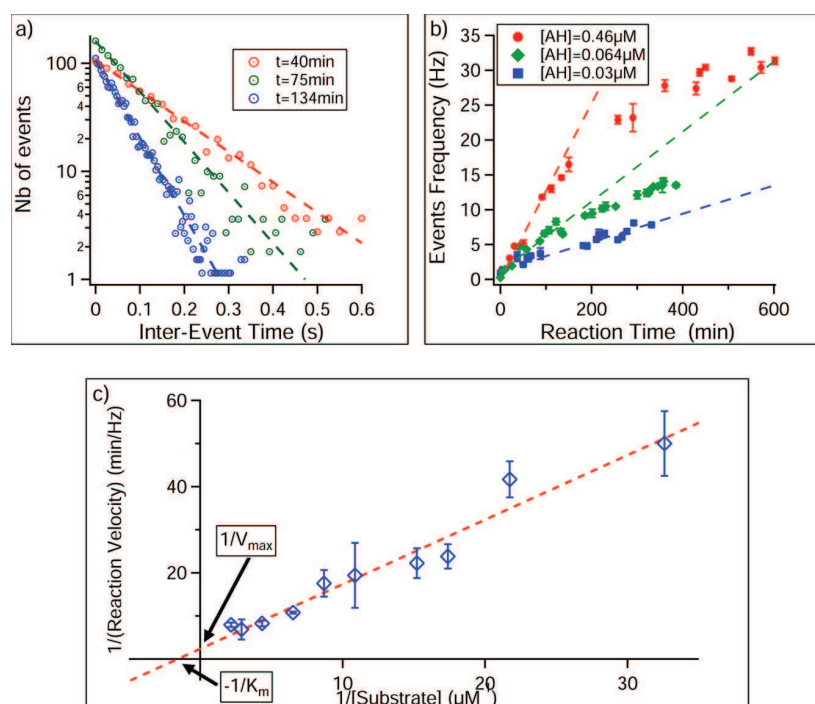
## EXPERIMENTAL SECTION

Hyaluronic acid is a long linear anionic polysaccharide chain ( $1.63 \times 10^6$  g/mol), composed of the repetition of two units of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine.<sup>23</sup> These dimers are linked by a  $\beta(1 \rightarrow 4)$  glycosidic bond, in which hydrolysis is catalyzed by hyaluronidase.<sup>24,25</sup> To carry out the kinetic study of the enzyme depolymerization, we incubate the HA substrate (HA sodium salt from *Streptococcus equi*, Sigma) in an increasing concentration range (30–460 nM) in the presence of enzyme (112 activity units, bovine testes hyaluronidase, Sigma) in a 0.08 M NaAc, 0.12 M NaCl, 0.9 M KCl, 1 mM

HEPES buffer at  $T = 21^\circ\text{C}$ . The reaction mixture is put into the cis compartment of the nanopore setup (Figure 1a), where a single aerolysin channel was inserted in a lipidic bilayer between both compartments. The aerolysin protein monomer is synthesized in the laboratory.<sup>13,26</sup> Single nanopore formation, nanopore recording, and spectrophotometric assay of hyaluronic acid depolymerization catalyzed by hyaluronidase were carried out as previously described.<sup>11</sup>

## RESULTS AND DISCUSSION

In the absence of enzyme and substrate, only the ionic current of the empty pore is observed. Upon addition of hyaluronic acid, current traces show some current blockades. In the presence of hyaluronidase, we observe an increase of the current blockades frequency as a function of an increasing



**Figure 2.** Kinetics evolution of the degradation of hyaluronic acid (HA) by hyaluronidase. (a) Distributions of the interevent times  $T_i$  are fitted by an exponential function ( $\approx \exp(-fT_i)$ ), where  $f$  is the characteristic event frequency  $f = 6.6 \pm 0.3$ ,  $11.3 \pm 0.8$ ,  $16.6 \pm 0.5$  blockades/s for the reaction times  $t = 40$ , 75, and 134 min, respectively, corresponding to the traces in the Figure 1. (b) Event frequency plots as a function of the reaction time for different substrate concentrations  $[HA] = 0.46$ ,  $0.064$ ,  $0.03 \mu M$ . Each initial velocity is calculated from the linear regression through the origin (dotted lines). (c) Lineweaver–Burk plot. Data are linearly fitted, allowing the determination of  $K_m$  and  $V_{\max}$  enzymatic parameters. The experiments are performed with 112 U hyaluronidase and various concentrations of HA in the buffer solution described in the Figure 1 caption.

reaction time (Figure 1b–d) and a modification of blockade durations (Figure 1e–g) as previously reported.<sup>11</sup> Here, we measure, by statistical analysis of current traces, the increase of event frequency as a function of reaction time for different substrate concentrations (Figure 2). As expected, we observe a decrease of the reaction rate as the substrate concentration decreases (Figure 2b). These experiments show that the nanopore technique is well suited to reaction durations as long as 10 h, much longer than the experiments performed previously.<sup>5,9</sup>

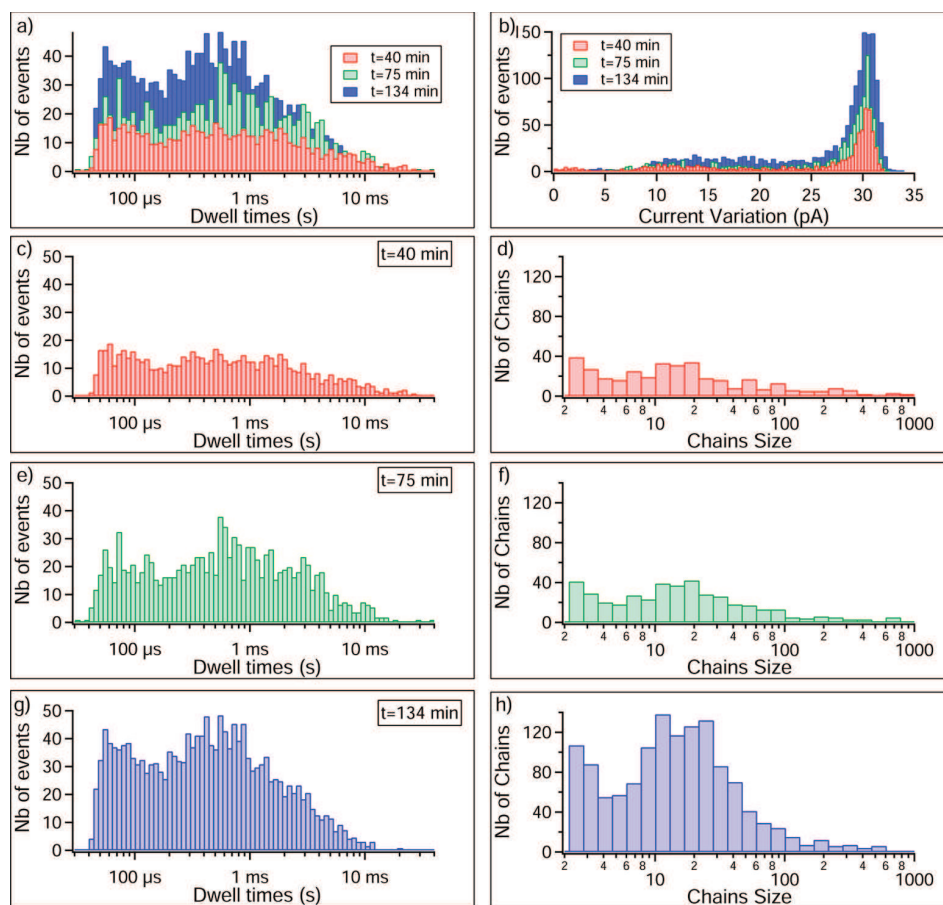
The kinetic parameters of the reaction were determined according to the Michaelis–Menten model. For that purpose, the initial reaction rate was calculated for each HA concentration from the slope of the dotted lines of Figure 2b) and then processed by using the Lineweaver–Burk double reciprocal plot, yielding a  $K_m$  value  $= 0.84 \pm 0.2 \mu M$  and  $V_{\max} = 0.58 \pm 0.15$  (events/second)/min.  $K_m$  represents the substrate concentration for which the reaction velocity is equal to  $V_{\max}/2$ . The number of blockades per second was converted into molar concentration by using a calibration experiment where the event frequency is measured in the presence of a known concentration of HA decasaccharide (Figure S1 in the Supporting Information). This calibration method overestimates the amount of long polysaccharide chains but allows a good estimation of  $V_{\max} = 2.49 \pm 0.7 \mu M/\text{min}$ .

We compare these results to the same reaction monitored by UV detection (Figure S3 in Supporting Information), yielding  $K_m = 0.9 \pm 0.15 \mu M$  and  $V_{\max} = 0.4 \pm 0.05 \mu M/\text{min}$ . We find the same value of  $K_m$  with single molecule and bulk detections. To explain the difference between both values of  $V_{\max}$ , we

consider the size distribution of polysaccharide chains at  $t = 40$  min, (Figure 3d) where the number  $N$  of disaccharide units varies between  $N = 2$  and  $N > 100$ . In this distribution, the average chain length is  $\langle N \rangle = 12 \pm 2$ , longer than the decasaccharide ( $N_{\text{deca}} = 5$ ). By taking into account the partitioning inside the nanopore and the bulk, the (event frequency)/concentration conversion using decasaccharide leads to an overestimation of  $\exp(\langle N \rangle / N_{\text{deca}}) = 13 \pm 5$ .<sup>27</sup> This overestimation leads to the one observed experimentally in the  $V_{\max}$  measurement,  $6 \pm 2.5$ . These results, obtained from the degradation of large polysaccharide chains, confirm that the nanopore technique could be generalized to the kinetic study of any enzymatic reaction.

If we focus on the current traces (Figure 1e–g), the blockade shapes are complex: they could be short with small amplitudes or long with large ones. The dwell time distribution at the beginning of the degradation ( $t = 40$  min in Figure 3a) is very homogeneous whatever the blockade duration. The end of the distribution is located for dwell times larger than 30 ms. At  $t = 75$  and 134 min, we observe an increase of the event number with reaction time and a translation of the distribution end toward shorter dwell times. Moreover, at long reaction times, we observe mainly two types of dwell time distributions: a first one located at  $60\text{--}80 \mu s$  and a large one at  $350\text{--}850 \mu s$ . Figure 3b confirms these observations: an increase of the number of events characterized by small current variations at  $10\text{--}20$  pA and a strong increase of current blockades at 30 pA. The first type of blockades is attributed to the transport of hexa- and octasaccharides, according to previous standardization experiments<sup>11</sup> and the second one to longer polysaccharides chains,





**Figure 3.** Size distributions during the degradation: (a) logarithm distributions of the dwell times, (b) current variation distributions corresponding to the current traces of Figure 1, (c, e, g) logarithm dwell times distributions, and (d, f, h) the corresponding simulated distributions.

which are not yet completely degraded. Then, these dwell time and current variation distributions confirm that the nanopore could be used as a mass spectrometer at the single molecule level to analyze directly the nature of the reaction mixture.<sup>28–30</sup>

To confirm these results, we model the degradation process by a random hydrolysis of the  $\beta(1 \rightarrow 4)$  glycosidic bonds (Figure S2 in the Supporting Information). On the basis of the average molecular weight of hyaluronic acid ( $1.63 \times 10^6$  g/mol), we assume that each polysaccharide chain comprised about 4300 dimers. We consider that the position of the hydrolysis by the enzyme on the chain is random: each degraded chain is randomly cut into two parts. As the HA chains are in diluted regime, we consider that the enzyme is diffusing in the solution and cuts randomly any polysaccharide fragment. The number of hydrolysis cycles is converted into time units by using the  $k_{\text{cat}}$  value (number of catalytic cycles per min) previously reported for hyaluronidase in the literature.<sup>25</sup> On the basis of the fact that this  $k_{\text{cat}}$  value was measured at 37 °C and that the enzyme activity at 21 °C was lowered by a factor  $3.3 \pm 0.2$  (Figure S4 in the Supporting Information),<sup>31</sup> this value was consequently adjusted for the following modeling.

Finally, the size distribution of polysaccharide chains could be plotted for various reaction times in Figure 3d–f. The experimental dwell times distributions are represented in Figure 3c,e,g for the same reaction times, respectively. We observe a correlation

between both types of distributions at  $t = 40$  min, the dwell time or size distribution is large and the fragments number is low. At  $t = 75$  min, the increase of chain number is confirmed by the increase of the number of blockade events. At  $t = 134$  min, the width of both distributions is thinner, the large increase of short blockades is consistent with the one of short chains number. The aim of this modeling is not the complete and precise simulation of the dwell time distribution, knowing that the transport of only one polysaccharide chain length is characterized by a large dwell-time distribution.<sup>11</sup> Nevertheless, this modeling confirms the correlation between the dwell time and the size distributions. This simulated result shows that the enzymatic hydrolysis is responsible for the appearance of blockades. However, we observe a strong increase of the tetramers oligosaccharides in Figure 3h that are not measured in Figure 3g. This result is consistent with our previous observations because our detection by the nanopore technique transport is limited by the 10 kHz low pass filter of the current amplifier:<sup>32</sup> blockades shorter than  $40 \mu\text{s}$  are missed as it is the case in the dwell time distribution plotted in Figure 3a.

Nevertheless, as the Michaelis–Menten model takes into account only the initial velocity of the degradation, the amount of small oligosaccharides is negligible at this step of the degradation and our analysis is relevant. By using the  $k_{\text{cat}}$  previously reported in literature (see above), adjusted for the reaction performed at 21 °C, and the  $V_{\text{max}}$  measured by

nanopore detection, we can reach the active hyaluronidase concentration  $[Enzyme] = V_{max}/k_{cat} = 0.5 \pm 0.13 \mu M$ .

## CONCLUSIONS

To conclude, we report a direct method for monitoring an enzymatic reaction of high molecular weight chains with nanopores, in order to determine the kinetic enzymatic parameters and to test the model validity by simulation. The enzymatic parameters ( $V_{max}$ ,  $K_m$ ) for polysaccharides depolymerization measured by single molecule or bulk detections have the same order of magnitude (Table 1). The data are well fitted

**Table 1. Comparison between the Single Molecule Nanopore Detection and the Bulk UV and Mass Spectrometry Measurements**

measurements	nanopore	UV absorbance	mass spectrometry
$K_m$ ( $\mu M$ )	$0.84 \pm 0.2$	$0.9 \pm 0.15$	
$V_{max}$ ( $\mu M/min$ )	$2.49 \pm 0.7$	$0.4 \pm 0.05$	
discrimination of the reaction products	+	–	+

by a Michaelis–Menten model. The real-time nanopore assay acts as a concentration sensor and allows the determination of the size distribution of the reaction product with time (Table 1). This ability could be very useful to follow in real-time many enzymatic reactions. This approach will offer a great potential for a future development for polysaccharide characterization. This detection method could be extended to other polymers or biomolecules as inside the extracellular matrix.

The matrix remodeling plays main roles in physiological and pathological processes.<sup>33</sup> In the future we plan to probe extracellular matrix degradation by proteases using a nanopore technique in order to fully understand previous bulk experiments and the theoretical model.<sup>34,35</sup>

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

Additional figures. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

\*E-mail: [regis.daniel@univ-evry.fr](mailto:regis.daniel@univ-evry.fr).

\*E-mail: [laurent.bacri@univ-evry.fr](mailto:laurent.bacri@univ-evry.fr).

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Ecole Doctorale Des Genomes Aux Organismes for a grant to A. Fennouri. We are grateful to A. Oukhaled for useful advice and interesting discussions.

## REFERENCES

- (1) Boos, W.; Shuman, H. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, *62*, 204–229.
- (2) López-Otin, C.; Bond, J. S. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 30433–30437.
- (3) Naik, S.; Goud, V. V.; Rout, P. K.; Dalai, A. K. *Renewable Sustainable Energy Rev.* **2010**, *14*, 578–597.
- (4) Law, B.; Tung, C.-H. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1683–1695.
- (5) Kasianowicz, J. J.; Brandin, E.; Branton, D.; Deamer, D. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 13770–13773.

- (6) Clarke, J.; Wu, H.-C.; Jayasinghe, L.; Patel, A.; Reid, S.; Bayley, H. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 265–270.
- (7) Olasagasti, F.; Lieberman, K. R.; Benner, S.; Cherf, G. M.; Dahl, J. M.; Deamer, D. W.; Akeson, M. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 798–806.
- (8) Macrae, M. X.; Blake, S.; Jiang, X.; Capone, R.; Estes, D. J.; Mayer, M.; Yang, J. *ACS Nano* **2009**, *3*, 3567–3580.
- (9) Zhao, Q.; de Zoysa, R. S. S.; Wang, D.; Jayawardhana, D. A.; Guan, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6324–6325.
- (10) Mohammad, M. M.; Iyer, R.; Howard, K. R.; McPike, M. P.; Borer, P. N.; Movileanu, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9521–9531.
- (11) Fennouri, A.; Przybylski, C.; Pastoriza-Gallego, M.; Bacri, L.; Auvray, L.; Daniel, R. *ACS Nano* **2012**, *6*, 9672–9678.
- (12) Sutherland, T. C.; Long, Y.-T.; Stefureac, R.-I.; Bediako-Amoa, I.; Kraatz, H.-B.; Lee, J. S. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1273–1277.
- (13) Pastoriza-Gallego, M.; Rabah, L.; Gibrat, G.; Thiebot, B.; van der Goot, F. G.; Auvray, L.; Betton, J.-M.; Pelta, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2923–2931.
- (14) Stefureac, R.; Waldner, L.; Howard, P.; Lee, J. *Small* **2008**, *4*, 59–63.
- (15) Merstorf, C.; Cressiot, B.; Pastoriza-Gallego, M.; Oukhaled, A.; Betton, J.-M.; Auvray, L.; Pelta, J. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 652–658.
- (16) Payet, L.; Martinho, M.; Pastoriza-Gallego, M.; Betton, J.-M.; Auvray, L.; Pelta, J.; Mathé, J. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4071–4076.
- (17) Bacri, L.; Oukhaled, A.; Hémon, E.; Bassafoula, F. B.; Auvray, L.; Daniel, R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *412*, 561–564.
- (18) Kullman, L.; Winterhalter, M.; Bezrukov, S. M. *Biophys. J.* **2002**, *82*, 803–812.
- (19) Parker, M. W.; Buckley, J. T.; Postma, J. P.; Tucker, A. D.; Leonard, K.; Pattus, F.; Tsernoglou, D. *Nature* **1994**, *367*, 292–295.
- (20) Song, L.; Hobbaugh, M. R.; Shustak, C.; Cheley, S.; Bayley, H.; Gouaux, J. E. *Science* **1996**, *274*, 1859–1866.
- (21) Mosher, D. F.; Sottile, J.; Wu, C.; McDonald, J. A. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1992**, *4*, 810–818.
- (22) Day, A. J.; Prestwich, G. D. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 4585–4588.
- (23) Glaser, L.; Brown, D. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1955**, *41*, 253.
- (24) Kreil, G. *Protein Sci.* **1995**, *4*, 1666–1669.
- (25) Cramer, J. A.; Bailey, L. C.; Bailey, C. A.; Miller, R. T. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1200*, 315–321.
- (26) Van der Goot, F. G.; Pattus, F.; Wong, K. R.; Buckley, J. T. *Biochemistry* **1993**, *32*, 2636–2642.
- (27) Daoud, M.; De Gennes, P. *J. Phys. (Paris)* **1977**, *38*, 85–93.
- (28) Reiner, J. E.; Kasianowicz, J. J.; Nablo, B. J.; Robertson, J. W. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 12080–12085.
- (29) Baaken, G.; Ankri, N.; Schuler, A.-K.; Rühe, J.; Behrends, J. C. *ACS Nano* **2011**, *5*, 8080–8088.
- (30) Kumar, S.; Tao, C.; Chien, M.; Hellner, B.; Balijepalli, A.; Robertson, J. W. F.; Li, Z.; Russo, J. J.; Reiner, J. E.; Kasianowicz, J. J.; Ju, J. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 684.
- (31) Hammond, E.; Li, C. P.; Ferro, V. *Anal. Biochem.* **2010**, *396*, 112–116.
- (32) Oukhaled, A.; Bacri, L.; Pastoriza-Gallego, M.; Betton, J.-M.; Pelta, J. *ACS Chem Biol* **2012**, *7*, 1935–1949.
- (33) Yamaguchi, H.; Wyckoff, J.; Condeelis, J. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2005**, *17*, 559–564.
- (34) Berry, H.; Pelta, J.; Lairez, D.; Larreta-Garde, V. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1524*, 110–117.
- (35) Lairez, D.; Carton, J.-P.; Zalczer, G.; Pelta, J. *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *98*, 228302.